ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR



PARIS. — L. MARETHEUX, IMPRIMEUR, 1, RUE CASSETTE.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

TOME VINGT-SIXIÈME

1912

AVEC VINGT-CINQ PLANCHES

PARIS

MASSON ET C[ie], ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6[e]).

26e ANNÉE JANVIER 1912 N° 1

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LE PNEUMOCOQUE

II. — CONSERVATION DE LA VIRULENCE DES PNEUMOCOQUES HUMAINS POUR LA SOURIS

par Ch. TRUCHE et L. COTONI.

Le pneumocoque ne possède pas l'extrême fragilité qu'on lui attribue communément. Ainsi, M. M. Nicolle a pu faire plusieurs années de suite des expériences, tant à Constantinople qu'à Paris, sans éprouver de difficultés sérieuses dans la conservation des germes qu'il étudiait. D'autres auteurs ont cité, de leur côté, des chiffres rassurants. Il n'en est pas moins vrai que le problème qui nous occupe n'a *jamais* été abordé systématiquement, avec la volonté arrêtée de trouver une technique simple et sûre, capable de s'appliquer indifféremment à tous les échantillons. C'est ce qui légitime les recherches que nous avons poursuivies depuis plus de deux ans et dont les résultats, comme on va le voir, nous ont donné pleine satisfaction.

Nous nous sommes proposé le *but* suivant : étant données des cultures d'origine humaine virulentes pour les souris, conserver indéfiniment leur activité initiale vis-à-vis des animaux, sans faire aucun passage, soit par souris, soit par une autre espèce.

Le *principe* de notre méthode consiste dans l'emploi de la gélatine (procédé de M. Nicolle et Adil-bey, pour la conservation du virus de la peste bovine). Nous allons faire connaître, successivement, la *technique suivie* et les *résultats obtenus*.

TECHNIQUE SUIVIE.

Voici le *schéma*, dont nous nous sommes rapprochés autant que cela était réellement possible. Les lacunes, inévitables en pareille matière, demeurent négligeables au regard du nombre d'échantillons étudiés (*quinze*) et de la quantité de titrages effectués (*des centaines*).

On a vu, dans notre travail antérieur, que nous partions toujours, pour le dosage initial, d'une culture en milieu T (1) (vingt-quatre heures à 37 degrés). En réalité, nous faisions, parallèlement, deux cultures-origines. L'une servait à déterminer la virulence « au départ » ; l'autre (n'ayant donc point passé par l'animal) était additionnée de deux volumes de gélatine à l'eau physiologique (gélatine à 15 p. 100, légèrement alcaline et préalablement fondue). Après mélange intime, on scellait le tube et on le portait à la glacière (*tube I*). Au bout d'un mois, on le retirait, on liquéfiait à une douce chaleur, on prélevait pour ensemencer en milieu T, on scellait de nouveau et on reportait à basse température. La culture-fille (*tube II*), après vingt-quatre heures d'étuve, était à son tour additionnée de gélatine et mise dans la glacière (avant l'addition de gélatine, on avait eu soin de prélever la quantité de liquide nécessaire à un titrage complet). Au bout d'un mois, le tube II était traité comme, jadis, le tube I ; et ainsi de suite. On réalisait, de cette façon, une *première série d'expériences*, destinée à conserver la virulence par des passages mensuels *in vitro*, suivis de mise à la glacière après addition de gélatine. Lors de chaque passage, l'activité des germes était, avons-nous dit, évaluée très exactement (inoculation dans les muscles gastrocnémiens des souris, à des doses variées : 1 cent. cube, 1/10 de cent. cube, 1/100 de cent. cube...) ; nous verrons, bientôt, ce qu'il en advient.

Il était non moins intéressant de chercher comment se comporte la virulence quand on supprime tout passage. Une *seconde série d'expériences*, destinée à élucider ce problème, a été conduite comme il suit. Le tube I (et, éventuellement aussi, un ou plusieurs des tubes II, III...) était sorti de la glacière tous les mois pour repiquage et remis aussitôt à basse tempé-

(1) Eau peptonisée à 4 p. 100 (peptone Chapoteaut), salée à 0,5 p. 100 et glucosée à 0,2 p. 100, de réaction légèrement alcaline (au tournesol.)

rature (après avoir scellé de nouveau lorsque le tube devenait trop court, on transportait son contenu dans un autre, avec les précautions ordinaires). Le titrage des cultures-filles mensuelles se pratiquait comme d'habitude.

Il nous a donc été possible de voir comment la virulence évoluait, d'un mois à l'autre, dans le cas des repiquages et en l'absence de ceux-ci. — Ajoutons que *cinq échantillons inactifs* « au départ » ont été soumis au même traitement que les *quinze échantillons actifs* mentionnés en commençant.

Résultats obtenus.

L'étude que nous résumons aujourd'hui constituait la *base indispensable* de nos recherches sur le pneumocoque. Si elle a nécessité de notre part un travail compliqué et, disons-le, assez pénible, elle nous a fourni par contre des résultats non seulement satisfaisants, mais encore très curieux à certains égards. Ces résultats se classent, d'après ce qui précède, sous deux chefs différents.

Première série d'expériences. — *Les pneumocoques très virulents* conservent indéfiniment leur activité; ainsi, l'échantillon Aynaud amène toujours la mort au dix-milliardième de centimètre cube.

Les cinq *pneumocoques avirulents* « au départ » (à la dose de 1 cent. cube) se sont montrés capables de tuer la souris, après quelques passages *in vitro*, aux doses de 1 cent. cube, 1/10 de cent. cube et même 1/100 de cent. cube, selon les échantillons. Nous espérons montrer tout à l'heure que ce résultat, incontestablement inattendu, ne doit pas être considéré comme entaché de mystère; la façon dont nos expériences ont été conduites ne permet point davantage de le considérer comme entaché d'erreur.

Les pneumocoques peu virulents demeurent le plus souvent stationnaires; quelquefois ils augmentent d'activité, quelquefois ils fléchissent ou deviennent même temporairement inactifs; rarement on les voit perdre leur virulence, mais rien ne permet alors de conclure, dans l'état actuel de nos recherches, à une perte définitive (voir plus loin).

Les pneumocoques de virulence moyenne restent généralement

stationnaires ou n'offrent que des oscillations modérées dans leur activité.

Par conséquent, les pneumocoques conservés à la glacière après addition de gélatine et repiqués chaque mois gardent, *dans la règle*, leur virulence pleine et entière; tout au plus observe-t-on des fluctuations sans importance qui paraissent d'ailleurs inconnues chez les échantillons très infectieux; *résultat essentiel au point de vue pratique*. — *Une minorité* de germes oscille, plus ou moins lentement, autour de notre zéro (survie après injection intramusculaire de 1 cent. cube). Parfois on suit l'oscillation tout entière (disparition *et* réapparition de la virulence); parfois, pensons-nous, on n'en suit que la moitié (disparition *ou* apparition de la virulence). Nous sommes convaincus, en effet, d'après notre pratique de la question, qu'on *doit* considérer l'apparition de la virulence chez les échantillons inactifs « au départ » comme une réapparition pure et simple (ce qui enlève au phénomène toute allure mystérieuse) — et qu'on *peut*, par contre, douter du caractère définitif de la perte de la virulence chez les échantillons actifs tombés à zéro (une avirulence irrévocable n'aurait, du reste, aucun cachet énigmatique).

SECONDE SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — *Les pneumocoques très virulents* conservent leur activité pendant au moins six mois; *les pneumocoques peu virulents*, pendant deux à trois mois; *les pneumocoques moyennement virulents*, pendant un temps intermédiaire. D'une façon générale, les résultats se montrent donc « logiques ». Toutefois, avec certains germes peu actifs, de curieuses oscillations ont été notées, ici encore. *Exemple*: on prélève dans un tube conservé six mois : culture-fille inactive; on prélève dans le même tube quatorze mois après : culture-fille active. Nous pourrions citer d'autres faits de même ordre; ils démontrent clairement combien il serait imprudent d'affirmer le caractère définitif d'une perte de virulence.

Nous n'insisterons pas sur la *conservation de la vitalité des pneumocoques*. Elle n'offre aucune difficulté. Même sans repiquages mensuels, les germes peuvent rester vivants *deux ans* (au moins) à la glacière, après addition de gélatine. A 37 degrés,

ils peuvent garder un an leur vitalité (les résultats se montrent ensuite incertains). — Comme il fallait s'y attendre, la virulence fléchit, dans la règle, bien plus à l'étuve qu'à la glacière; on observe quelquefois, il est vrai, de bien singulières exceptions, mais elles sont trop rares pour mériter une mention détaillée.

Parallèlement aux pneumocoques humains, nous avons étudié quelques pneumocoques d'origine animale dont il sera question dans nos travaux ultérieurs et qu'il convient, par conséquent, de « présenter » dès maintenant. Nous laissons avec plaisir ce soin à M. Grenier, notre collaborateur de tous les jours, qui a isolé la plupart de ces échantillons.

III. — SUR QUELQUES PNEUMOCOQUES D'ORIGINE ANIMALE

(VIRULENCE POUR LA SOURIS CONSERVATION DE CETTE VIRULENCE)

par M. GRENIER.

Les germes dont il va être question proviennent du *cobaye* (8 échantillons), du *lapin* (3 échantillons), et du *cheval* (1 échantillon). Comme l'histoire des pneumocoques animaux est encore peu avancée, il nous a paru utile de résumer, chemin faisant, ce que l'on en sait actuellement.

Pneumocoques des cobayes. — M. M. Nicolle, à propos de ses études sur la morve expérimentale du cobaye, a fait connaître le pneumocoque qui détermine la « maladie du nez » de cette espèce animale (1). Il a décrit les symptômes et lésions de l'affection, dans ses formes nasales et extranasales et mentionné les caractères principaux de l'agent pathogène, d'après

(1) Sous le nom, éminemment défectueux, de *pseudo-pneumocoque*. Nous sommes convaincu, aujourd'hui, de la nécessité d'abolir radicalement en bactériologie les préfixes pseudo et para. Il est bien plus rationnel, croyons-nous, de délimiter d'une façon suffisamment compréhensive chaque groupe microbien, puis d'y pratiquer les subdivisions intérieures jugées nécessaires, que de partir d'une définition trop étroite et de se trouver alors obligé d'*opposer* à un type « vrai » (seul légitime, seul orthodoxe) des types « faux » ou « à côté » (expressions aussi arbitraires que vides de sens), procédé qui conduit fatalement à une indétermination complète. — M. Nicolle.

les travaux du Dr Girard. Il a insisté aussi sur ce fait que le pneumocoque des cobayes, qui se rencontre chez les *sujets sains* à l'état saprophytique au niveau des voies digestives et respiratoires, et chez les *sujets d'apparence saine* au niveau de certaines lésions latentes, entre fréquemment en activité à la suite de l'injection des bacilles morveux vivants ou morts et manifeste alors cette activité sous forme d'infections locales, localisées ou septicémiques. La « sortie » est particulièrement à redouter chez les cobayes hypersensibles. Dans les expériences les plus diverses, poursuivies depuis son travail sur la morve (administration de toxines variées et de microbes, vivants ou morts, non moins variés), M. Nicolle a pu se convaincre de la *banalité* véritable du phénomène observé par lui, et les très nombreuses autopsies, qu'il nous a chargé de faire à ce point de vue, nous ont montré qu'à part quelques poussées épidémiques (somme toute, assez rares) et un nombre limité de cas sporadiques, les infections pneumococciques des cobayes, dans leurs différentes formes, reconnaissent pour cause la « sortie » des germes, provoquée par des injections toxiques ou virulentes; elle se produit *à chaque instant* et il n'est point de semaine où l'on ne puisse recueillir plusieurs échantillons des microbes en question. A la vérité, ceux-ci apparaissent volontiers en même temps que la *pasteurella* (comme l'a indiqué, également, M. Nicolle), mais leur isolement n'offre aucune difficulté.

Les spécimens, étudiés par nous, ne représentent qu'une infime minorité de ceux que nous possédions. Deux d'entre eux, inactifs vis-à-vis des souris, ont été laissés de côté. Les autres offraient une virulence moyenne ; conservés dans la glacière après addition de gélatine et repiqués mensuellement, l'un a perdu son activité, les autres l'ont gardée, avec ou sans fléchissement selon les cas.

Pneumocoques des lapins. — M. Nicolle a constaté la grande rareté des infections pneumococciques « spontanées » des lapins, mais il a vu « sortir » assez souvent le pneumococoque chez les sujets sains (en apparence ou en réalité), d'abord dans ses recherches sur le phénomène d'Arthus, puis au cours d'autres travaux où les animaux étaient traités par des injec-

tions de toxines ou de microbes. Parfois la *pasteurella* de la « maladie du nez » des lapins apparaissait en même temps.

C'est uniquement chez des lapins soumis à des infections expérimentales que nous avons trouvé nos trois échantillons. Le premier venait d'un animal inoculé avec la bactéridie charbonneuse, qui nous a été remis par M. Jouan; les deux autres de sujets inoculés avec le bacille de Schmorl, qui nous ont été donnés par MM. Cesari et Alleaux. L'échantillon Jouan, très virulent, a conservé intégralement son activité, grâce au procédé Truche et Cotoni; les échantillons Cesari et Alleaux, peu virulents, ont nettement « remonté » dans les mêmes conditions.

Pneumocoque du cheval. — Nous l'avons isolé d'un abcès pulmonaire à bacille de Schmorl, que nous avait remis M. Cesari. Le mécanisme de son développement *in vivo* s'explique par une « sortie » analogue à celle observée chez les deux lapins dont il vient d'être question. « Au départ », notre microbe ne tuait pas la souris; après quelques passages *in vitro* (addition de gélatine et mise à la glacière), il est devenu actif, comme les cinq pneumocoques humains mentionnés dans le travail précédent.

Nous espérons avoir le temps de compléter ces données, encore trop fragmentaires, sur les pneumocoques animaux. Il semble bien que l'on doive retrouver chez eux les mêmes caractères généraux et les mêmes types particuliers que dans la série des pneumocoques humains.

EXTRACTION DE LA ZYMASE PAR SIMPLE MACÉRATION

par ALEXANDRE LEBEDEFF.

Il y a bien peu de questions, dans la chimie biologique, qui aient, autant que l'extraction de la zymase, attiré sur elles l'attention des savants, soit par l'importance du problème à résoudre, soit par les noms illustres qui ont pris part à la discussion et dont le retentissement a trouvé un écho même au delà du cercle étroit des spécialistes. Il s'agissait en effet de savoir si la fermentation alcoolique est due aux forces vitales de la cellule de levure ou bien à une banale diastase.

Je ne suivrai pas ici toutes les péripéties de la discussion dont les grands traits sont connus de tous et qui a été tranchée d'un seul coup par Buchner; qu'il me soit seulement permis de souligner qu'on a tort de penser que Pasteur niait la possibilité de l'existence d'une diastase : bien au contraire, il l'a cherchée lui-même, en collaboration avec ses élèves, et ce ne sont que les résultats négatifs de ses tentatives expérimentales, obtenus d'ailleurs par nombre de savants (1), qui l'ont amené à combattre la théorie de Moritz Traube, soutenue par Berthelot, comme n'ayant aucune base expérimentale.

Quelle était la cause de cet insuccès?

Pasteur aussi bien que Buchner, d'après le témoignage de M. Roux (2), a broyé la levure dans un mortier, en a congelé les cellules pour les faire éclater et comme Lintner (3) et Van Laer (4) il a essayé de faire sortir le suc à travers l'enveloppe par osmose. Mais rien n'y fit. Actuellement, après les recherches

(1) Voir la littérature sur ce sujet dans le *Zymasegärung* (p. 12-14, 1903) de E. et H. Buchner et M. Hahn et le très intéressant chapitre sur la fermentation alcoolique dans le livre de J. Duclaux : *La Chimie de la matière vivante* (1910).

(2) *Annales de la Brasserie et de la Distillerie*, p. 512, 1898.

(3) *Centralbl. f. Bakteriologie*, II, t. V, p. 796, 1899.

(4) *Chem. Centralbl.*, t. I, p. 352, 1901.

de Hayduck (1), Delbrück, Lange, König et Haymann (2), qui ont démontré que l'état de la levure est un facteur très important de son activité, la réponse à la question ci-dessus est facile : c'est que Pasteur a pris de la levure qui ne donnait pas de suc actif. Il arrive souvent, par exemple, que la levure provenant de la même brasserie donne un jour du suc très actif et un autre jour du suc très peu actif ou même inactif. D'autre part, la race joue aussi un rôle prépondérant : la levure haute, dite « parisienne », comme j'ai pu le constater, ne donne pas de suc actif ni d'après le procédé Buchner, ni d'après le mien.

Or, Buchner a commencé ses expériences avec la levure de Munich qui donne presque toujours un suc actif et il n'est pas étonnant qu'il ait réussi. On peut dire, sans vouloir en quoi que ce soit amoindrir le grand et incontestable mérite de E. et H. Buchner, mérite de chercher quand même malgré l'insuccès complet de ses prédécesseurs, que l'isolement de la zymase peut servir d'exemple classique du rôle que joue parfois la chance dans les découvertes scientifiques.

Après les belles expériences de E. et H. Buchner, tout le monde convenait que l'on ne pourrait extraire la zymase que par l'action mécanique (broyage, congélation), ou chimique (dissolvants divers de la membrane), et que le procédé de Buchner était le plus pratique, bien qu'il exigeât un matériel très cher (presse hydraulique, appareil de broyage, etc.).

En 1907, j'ai commencé mes expériences sur la kynétique de la fermentation alcoolique, mais au premier pas je me suis heurté à la difficulté que la presse n'était pas toujours disponible aussi bien que la levure. Il fallait imaginer quelque chose pour y remédier et ne pas mettre les expériences sous la dépendance de ces circonstances accidentelles. Pour cela, j'ai commencé à employer la levure sèche en la mélangeant avec de l'eau (une partie de levure pour deux d'eau), et la broyant (3) ensuite comme d'ordinaire. Les premiers essais

(1) *Wochenschrift f. Brauerei*, t. I, p. 177, 345, 697, 1884.

(2) *Jahrb. der Vers. u. Lehranst. f. Brauerei*, t. IV, p. 16, 158, 298, 1901. Cité d'après Buchner : *loc. cit.*, p. 69; 275-276.

(3) Le broyage est une opération pénible et qui même n'est pas sans danger pour la santé.

ont mal réussi. Le suc était très peu actif. En cherchant la cause, j'ai constaté que la levure sèche restait en grande partie intacte pendant le broyage avec du sable et de la terre d'infusoire. C'est pourquoi j'ai laissé la levure avec de l'eau pendant quelque temps à la température ordinaire jusqu'à ce qu'il se forme une masse bien homogène; broyée ensuite, elle a donné le suc non seulement extrêmement actif, mais s'écoulant de la presse deux à trois fois plus vite, ce qui était important pour moi. Ordinairement, c'est-à-dire d'après la méthode de Buchner, il fallait presser au moins trois heures : d'après la modification que j'ai apportée, il suffisait d'une heure à une heure et demie; en outre le suc était très clair et, laissé seul, sans addition de sucre, il ne dégageait pas d'acide carbonique, étant privé de glycogène, circonstance qui dans beaucoup de cas devient très avantageuse.

J'ai mené alors une série d'expériences parallèles, broyant la levure fraîche et la même levure préalablement desséchée (1) et j'ai pu constater que le suc de la levure séchée était toujours plus actif; il arrivait même souvent que le suc de la levure fraîche (de la brasserie de Schultheiss à Berlin) était presque inactif et ne s'écoulait que très difficilement, de sorte que d'un kilogramme de levure je n'obtenais que 100 et même 50 cent. cubes au lieu de 500 ou 400 cent. cubes, tandis qu'après la dessiccation elle donnait un suc très actif.

La levure séchée, enveloppée seulement dans le papier-filtre, conservait son activité très longtemps. Comme exemple je puis citer ici le cas d'une levure (Schultheiss, à Berlin) qui après deux ans a montré son pouvoir de fermentation égal à 1,4 au lieu de 1,9 qu'elle avait donné au commencement. Cette circonstance permet de faire des expériences absolument comparatives pendant un temps très long, et « last not least », on sait toujours d'avance la quantité et l'activité du suc qu'on obtiendra d'un certain poids de levure (2). Je travaillais pendant deux ans en me servant de cette modification de laméthode de Buchner. En con-

(1) Je commençais par sécher la levure à la température de 35 à 45 degrés, pendant quatre à cinq heures (d'après le procédé de Buchner et Mitscherlich : *Zeischr f. Physiol. Chem.*, t. XLII, p. 554, 1904), et l'exposais ensuite à la température ordinaire.

(2) *Biochem. Zeitschr.*, t. XX, p. 116, 1909.

tinuant ensuite mes recherches au laboratoire d'Émile Fischer j'ai rencontré une autre difficulté : il y avait bien là la presse hydraulique, mais pas d'appareil pour le broyage de la levure. Au lieu de suc j'ai essayé d'employer directement la levure sèche pour produire synthétiquement l'éther du sucre et de l'acide phosphorique dont je poursuivais alors l'étude (1). Pour interrompre la fermentation, je chauffais le liquide de fermentation au bain-marie et c'est pendant cette opération que mon attention fût attirée par la coagulation de tout le liquide, comme s'il se fût agi d'une solution des albuminoïdes et non pas d'une suspension des levures. Cette observation m'a donné pour la première fois l'idée d'essayer si le suc de macération ne fermermenterait pas, et mes recherches dans cette direction ont été couronnées d'un plein succès (2).

Je vais maintenant décrire la méthode de préparation du suc de macération et les expériences que j'ai entreprises pour préciser les conditions dans lesquelles on obtient le maximum d'activité, ainsi que quelques propriétés essentielles du suc.

Méthode.

On prend un seau de levure fraîche, on le met dans un récipient cylindrique, d'une contenance d'au moins 50 litres, on le place sous le robinet d'une conduite d'eau muni d'un tube de caoutchouc ; le récipient une fois rempli, on laisse couler le robinet légèrement pendant tout le temps du lavage. De temps en temps on remue bien la levure avec un bâton en bois. Si l'on fait soigneusement cette opération, l'eau dans le récipient devient tout à fait claire, la levure, bien divisée et blanche, tombant vite sur le fond du récipient. On laisse la levure immergée sous l'eau sans fermer le robinet pendant une nuit.

En été il est préférable de mettre dans le récipient un gros morceau de glace après avoir fermé le robinet. Le matin, on trouve la levure bien déposée au fond du vase. On procède alors au décantage, puis on prend une grande terrine, sur

(1) *Ibid.*, t. 28, p. 226, 1910.
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, séance du 3 janvier et du 24 avril 1911. — *Bul. de la Soc. chim. de France*, séances du 27 janvier et du 24 mars 1911.

laquelle on place un tamis avec des trous assez grands (5 cent. carrés par exemple), on le recouvre d'une toile à filtrer bien mince et on jette dessus la levure. Après l'avoir laissée égoutter pendant quelque temps, on prend les quatre bouts de la toile, on les réunit ensemble et on les ficelle. Ensuite, on l'enveloppe avec une toile à presser, on met le tout sous une presse à main sur laquelle on agit jusqu'à ce que la levure devienne assez compacte pour la faire passer à travers un tamis, ayant des mailles de 5 cent. carrés, qui se trouve au-dessus du papier-filtre placé sur un portoir en bois. On étale la levure tamisée en une couche de 1 à 1 1/2 centimètre d'épaisseur, et on laisse ensuite sécher à une température de 25 à 35 degrés. En deux jours la levure est complètement sèche.

A ceux qui voudraient s'éviter la peine de cette opération préliminaire et la perte de temps, je conseille de faire venir la levure de chez M. Schroder, à Munich (1), qui la prépare d'après mes indications (2). Elle est toujours très active et propre. Pour obtenir le suc, on prend 50 grammes de levure séchée (3), on ajoute 150 grammes d'eau, on mélange bien avec une baguette en verre dans une capsule et on laisse macérer à 35 degrés pendant deux heures, ou à 25 degrés pendant six heures. Après on jette la masse sur le filtre ordinaire et on la laisse s'écouler. Il n'y a pas besoin de refroidir le filtrat par de la glace (sinon en été), mais si l'on veut obtenir le plus possible de suc (en 12 heures on peut en avoir de 70 à 80 cent. cubes), il est préférable de le faire, parce que la filtration devient de plus en plus lente (4). On pourrait aussi séparer le suc de la levure en centrifugeant le mélange à la vitesse de 3.000 tours à la minute, ou en pressant à travers un filtre-presse, etc. On peut conserver le suc assez longtemps après

(1) *Landwehrstr*, p. 45, K°-2 M.

(2) Il me semble qu'elle pourrait remplacer la levure fraîche ou la levure desséchée par l'acétone (zymine), dans le traitement de certaines maladies. Il serait intéressant que des expériences dans cette direction fussent faites par des médecins.

(3) Si l'on veut obtenir une plus grande quantité de suc, il est préférable de faire macérer dans plusieurs capsules en mettant dans chacune 50 grammes de levure sèche et en en filtrant le contenu, après la macération avec de l'eau, séparément.

(4) Au commencement de la filtration en 15-20 minutes on obtient de 25 à 30 centimètres cubes de suc.

l'avoir congelé complètement dans un mélange de glace et de sel, d'après F. B. Ahrens et J. Meisenheimer (1).

En faisant macérer la levure pendant vingt-quatre heures, à une température un peu au-dessus de 0 degré (3 degrés par exemple), ce qui est facile en hiver, en opérant dehors, on obtient ordinairement, mais pas toujours, des sucs bien actifs. Étant donné qu'en été la macération à une température aussi basse devient difficile, souvent même impossible, surtout si l'on veut la maintenir constante, je recommande pour cette raison la macération à 35 degrés au thermostat, d'autant plus qu'en l'espace de deux heures on obtient déjà du suc, dont l'activité dépasse souvent celle du suc obtenu à une température très basse ; en outre elle est plus *régulière*, ce qui est important pour les recherches comparatives.

Je viens d'indiquer jusqu'ici comment on obtient assez rapidement le maximum d'activité ; je vais maintenant rendre compte des expériences entreprises pour arriver à une étude systématique des conditions qui le favorisent.

Exp. I, *a*). — Pour cette expérience, ainsi que pour toutes les expériences semblables, je me suis servi de petites fioles d'Erlenmayer (80 cent. cubes à peu près avec une soupape de fermentation de Meissl) que je chargeais de 20 cent. cubes de suc, 8 gr. de sucre et de 0,2 cent. cubes de toluène. C'est par cette méthode que Buchner déterminait le pouvoir fermentatif de son suc et j'ai jugé utile, pour obtenir des données comparables à celles de Buchner, d'adopter la même méthode, purement empirique, bien qu'il soit plus rationnel d'exprimer l'activité du suc par une constante de la vitesse de la réaction pour la concentration optima en se servant de l'appareil de Valton (2).

Levure de Moritz du 30 décembre (1 : 3), séchée à 25 degrés. La concentration a été calculée pour 25 cent. cubes, 8 gr. de saccharose augmentant le volume du liquide après la dissolution de 5 cent. cubes. Pour 50 gr. de la levure séchée, j'ai pris 150 gr. d'eau et j'ai laissé macérer pendant 3 et 6 heures à 25 degrés (N°s 1 et 2). Après filtration j'ai recueilli 20 cent. cubes de suc en 25 minutes.

N^os	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR							GRAMMES CO^2
			1	2	3	4	6	7	8	
1	20	32	0,53	0,48	0,38	0,21	0,20	0,02	0,00	1,82
2	»	»	1,27	0,67	0,36	»	0,33	0,00	»	2,63

(1) *Zymasegärung*, p. 226, 1903.
(2) *Biochem. Zeitschr.*, t. X, p. 456 et t. XXVIII, p. 227-228.

Exp. I, *b*). — On a laissé s'écouler le même suc à la température ordinaire pendant une nuit, et le jour suivant, c'est-à-dire après 17 heures de filtration, on a fait l'expérience analogue à I *a*.

Nos	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 PAR JOUR					GRAMMES CO^2
			1	2	3	5	6	
1	20	32	1,00	0,06	0,03	0,07	0,00	1,16
2	»	»	1,04	—	—	0,60	0,00	1,64

Exp. II, *a*). — La même levure macérée pendant 20 heures à 15 degrés, avec trois parties d'eau.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 PAR JOUR					GRAMMES CO^2
		1	2	3	5	6	
20	32	1,34	0,35	0,09	0,02	0,00	1,79

Exp. II, *b*). — La même levure, macérée à 3 degrés (dehors) avec 3 parties d'eau pendant 24 heures.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2
		1	2	4	5	6	7	
20	32	0,60	0,68	0,60	0,06	0,05	0,00	1,99

Exp. II, *c*). — Le même suc qu'on a laissé s'écouler pendant 24 heures à la température ordinaire. Le suc a commencé à fermenter de suite, mais la fermentation ne dura qu'un jour.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 PAR JOUR			GRAMMES CO^2
		1	2	3	
20	32	0,54	0,02	0,00	0,56

Exp. III. — La même levure, mais macérée pendant 19 heures à 25 degrés. Le suc a commencé à fermenter de suite.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 PAR JOUR			GRAMMES CO^2
		1	2	3	
20	32	0,89	0,03	0,00	0.92

Exp. IV. — La même levure, mais séchée à 35 degrés, et macérée ensuite à 25 degrés, pendant 5, 6 et 7 heures, et à 0 degré pendant 24 heures, avec 3 parties d'eau (Nos 1, 2, 3, 4). Le mélange en parties égales de ces quatre sucs contenait 16, 17 p. 100 de résidu sec. Le suc macéré à 0 degré contenait 14,90 p. 100 de résidu sec.

NUMÉROS	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100	MACÉRATION		GRAMMES CO^2 par jour.				GRAMMES CO^2.
			heures.	degrés.	1	2	5	6	
1	20	32	5	25	0.68	0,36	0,20	0,00	1.24
2	»	»	6	25	0.77	0.41	0.27	»	1.45
3	»	»	7	25	0,79	0,36	0,20	»	1.35
4	»	»	24	0	0.53	0.55	0,00	»	1.08

Exp. V. — La même levure séchée à la température ordinaire et macérée ensuite pendant 2 heures à 35 degrés, avec 3 parties d'eau (Résidu sec 15,66 p. 100).

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 par jour.				GRAMMES CO^2.
		1	2	5	6	
20	32	0.42	0.25	0.09	0,00	0.76

Exp. VI. — La même levure que dans l'expérience IV, mais après trois mois de conservation, a été macérée pendant 2 heures à 35 degrés.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 par jour.						GRAMMES CO^2.
		1	3	4	5	7	8	
20	32	0,45	0,65	0,13	0,07	0,05	0,00	1,35

Exp. VII, *a*). — Levure du 10 janvier (Moritz), lavée et pressée le même jour, séchée à 35 degrés, macérée pendant 4 h. 1/2 à 25 degrés avec deux parties d'eau. Cette levure broyée avec du sable a donné du suc qui ne fermentait pas du tout le sucre.

La quantité d'acide carbonique dégagé pendant le deuxième jour est trois fois plus grande que pendant le premier. Ceci s'explique par ce fait que la fermentation a commencé après quelques heures seulement. Il y a des cas, d'ailleurs rares, où la fermentation ne commence qu'après 24 heures et même davantage. Il est difficile, sans connaître complètement le mécanisme de la fermentation, de donner une explication de ce phénomène curieux ; on peut faire seulement des suppositions plus ou moins plausibles.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2
		1	2	3	4	6	7	
20	32	0,28	0,66	0,46	0,28	0,22	0,01	1,91

Exp. VII, *b*). — Le même suc qu'on a laissé s'écouler pendant 16 heures à la température ordinaire.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR				GRAMMES CO^2
		1	2	3	4	
20	32	0,41	0,36	0,02	0,00	0,79

Exp, VIII, *a*). — Les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, mais la levure a été séchée à 25 degrés.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2
		1	2	3	5	6	7	
20	32	0,70	0,82	0,40	0,31	0,04	0,00	2,27

Exp. VIII, *b*). — Le même suc après 16 heures de filtration à la température ordinaire.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR				GRAMMES CO^2
		1	2	4	5	
20	32	0,50	0,68	0,26	0,00	1,44

Exp. IX, *a*). — La même levure séchée à 15 degrés et macérée ensuite pendant 4 h. 1/2 à 25 degrés avec 3 parties d'eau. Après l'addition du sucre aucune fermentation ne s'était produite.

Exp. IX, *b*). — Le même suc après 16 heures de filtration. Il a commencé à fermenter le deuxième jour.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 par jour.			GRAMMES CO^2
		3	4	5	
20	32	0,11	0,03	0,00	0,14

Exp. X, *a*). — La même levure, mais pressée le jour suivant, c'est-à-dire, après le séjour sous l'eau froide pendant la nuit, séchée ensuite à 35 degrés et macérée 4 h. 1/2 à 25 degrés.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES CO^2 par jour.						GRAMMES CO^2
		1	2	3	5	6	7	
20	32	0,69	0,74	0,67	0,32	0,05	0,00	2,17

Exp. X, *b*). — Le même suc après 16 heures de filtration à la température ordinaire.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 par jour.				GRAMMES CO^2
		1	2	3	5	
20	32	0,68	0,21	0,01	0,00	0,89

Exp. XI, *a*). — La même levure (X *a*) séchée à 25 degrés et macérée ensuite 4 h. 1/2 à 25 degrés avec 3 parties d'eau

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 par jour.					GRAMMES CO^2
		1	2	5	6	7	
20	32	1,30	0,76	0,41	0,03	0,00	2,50

Les expériences X et XI montrent qu'il est préférable de laisser la levure sous l'eau froide que de la presser le même jour, comme dans les expériences VII et VIII.

Exp. XI, *b*). — Le même suc après 16 heures de filtration.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR				GRAMMES CO^2
		1	3	4	5	
20	32	1,04	0,42	0,02	0,00	1,48

Exp. XII. — Les sucs des expériences X *a* et XI *a* ont été mélangés à parties égales, et à 20 cent. cubes de ce mélange on a ajouté 2 gr. de sucre.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR			GRAMMES CO^2
		1	2	3	
20	10	0,66	0,06	0,00	0,72

Exp. XIII, *a*). — La même levure que dans l'expérience X, séchée à la température ordinaire et macérée 4 h. 1/2 à 25 degrés, a donné du suc qui a commencé à fermenter le sucre (8 gr. pour 20 cent. cubes) le deuxième jour seulement; il donna en 24 heures 0,33 grammes de CO^2, et la fermentation s'arrêta brusquement.

Exp. XIII, *b*). — Le même suc après 16 heures de filtration n'a commencé à fermenter que le deuxième jour. La fermentation ne dura que deux jours.

CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION p. 100.	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR			GRAMMES CO^2
		3	4	5	
20	32	0,31	0,18	0,00	0,49

Exp. XIV. — Les sucs des expériences IX *b* et XIII *b* ont été mélangés et à 20 cent. cubes (10 c. c. + 10 c. c.) on a ajouté 2 grammes de sucre. La fermentation commença après 24 heures et continua deux jours. 0,54 grammes d'acide carbonique se sont dégagés. Il va de soi que du toluène a été ajouté et même en quantité double (0,4 cent. cubes au lieu de 0,2) en vue de la faible concentration en sucre.

Le résultat étrange des expériences IX *a*, IX *b* et XIII *a* et XIII *b* ne peut être, en aucune manière, attribué à l'infection du liquide par levure vivante. On ne peut l'expliquer pour le moment, nos connaissances sur le mécanisme intime de la fermentation n'étant pas encore complètes. Il est à remarquer que les sucs pris après une longue filtration ne fermentent que 2-3 jours; ce fait est dû évidemment à la destruction de la coenzyme par une diastase spéciale, dont la présence dans le suc, d'après Buchner et Klatte, est très probable (1). Le suc obtenu par macération de la levure séchée à la temperature ordinaire ne manifeste presque aucune ou une très faible activité si la concentration en sucre est forte; si elle est faible, la fermentation commence, mais après un laps de temps plus ou moins long, pendant lequel se produisent probablement des réactions, le préparant pour ainsi dire à l'activité. Le temps de repos est suivi d'une activité croissante; ce phénomène est analogue à celui qui a lieu dans les réactions chimiques consécutives et qui a été nommé par Bunsen et Roscœ période

(1) *Biochem. Zeitschr.*, t, VIII, p. 520, 1908.

de l'induction (1). Mellor a démontré que celui-ci était une conséquence nécessaire de la loi de l'action de la masse et énoncé la loi : « the period of induction is characteristic of chemical reactions which take place in a series of intermediate stages » (2). D'autre part, j'ai pu démontrer que la disparition du sucre et le dégagement de l'acide carbonique dans la fermentation alcoolique sont des processus différents (3); c'est pourquoi je propose de nommer la période d'inertie qui précède la fermentation même, et est suivie ensuite d'une croissance de la vitesse de la réaction, comme une période de l'induction; les expériences suivantes montrent que cette période peut être accélérée par élévation de la température ou diminution de la concentration du sucre (4).

Exp. XV, *a*). — La levure Moritz a été séchée à 15 degrés, macérée à 25 degrés pendant 4 h. 1/2 avec 3 parties d'eau (XIII *a*). On a pris quatre fioles (1, 2, 3, 4) avec des soupapes de fermentation; à chacune d'elles on a ajouté 20 cent. cubes de suc et 0,2 de toluène. Aux fioles 1 et 3 on a ajouté en outre 8 grammes de sucre à chacune, et, aux fioles 2 et 4, 2 grammes à chacune. Les deux fioles 1 et 2 ont été mises à fermenter au thermostat à 25 degrés et les autres (3 et 4) à 35 degrés.

La fiole 1 a commencé à fermenter le deuxième jour et a donné dans 24 heures 0,33 grammes de CO^2.

La fiole 2 a commencé à fermenter après 2 heures et a donné 0,71 grammes de CO^2. La fermentation dura 3 jours.

La fiole 3 a commencé à fermenter aussitôt l'addition du sucre et a donné en 24 heures 0,18 grammes de CO^2. Le suc s'étant coagulé, je mis la fiole à 25 degrés; le deuxième jour il s'est dégagé 0,09, le troisième 0,13, le quatrième et cinquième ensemble 0,21 d'acide carbonique, ce qui fait en tout 0,66 grammes.

La fiole 4 a commencé à fermenter aussitôt l'addition de sucre et a donné dans 24 heures 0,42 grammes de CO^2.

Exp. XV, *b*). — La même levure séchée à 15 degrés, mais macérée à 35 degrés pendant 2 heures avec 3 parties d'eau. Le tableau suivant donne le résultat des expériences XV et XV *b* ensemble.

(1) Voir la littérature sur ce sujet dans le beau livre de Mellor : *Chemical Statics and Dynamics*, p. 113-118. 1908.

(2) *Jour. Chem. Soc.* t. LXXXI, 1280, 1902.

(3) *Biochem. Zeitsch.*, t. X, p. 456, 1890, et t. XXVIII, p. 227, 228, 1910. Je publierai prochainement un mémoire spécial sur la kynétique de la fermentation alcoolique. Jusqu'à présent on admettait ordinairement (Aberson, Hertzog, Euler) que ce processus était simple et obéissait à la loi d'une réaction monomoléculaire; en vérité il consiste au moins en deux réactions consécutives.

(4) Elle peut être considérablement retardée par l'addition des phosphates.

NUMÉROS	MACÉRATION		C.C. DE SUC	CONCENTRATION p. 100.	TEMPÉRATURE	GRAMMES DE CO^2 par jour.					GRAMMES CO^2.	REMARQUES
	degré.	heures.				1	2	3	5	6		
1	25	4 1/2	20	32 »	25	»	0,33	0,00	»	»	0,33	Commence 2e jour.
2	»	»	»	9,5	»	0,60	0,07	0,04	0,00	»	0,71	Après 2 heures.
3	»	»	»	32 »	35	0,18	0,09	0,13	0,26	0,00	0,66	Aussitôt l'addition; coagulation à 35°, à partir du 2e jour mis à 25°.
4	»	»	»	9,5	»	0,42	0,00	»	»	»	0,42	»
5	35	2	»	32 »	25	0,83	0,35	0,13	0,05	0,00	1,36	Après quelques heures.
6	»	»	»	9,5	»	0,65	0,06	0,03	0,00	»	0,74	Aussitôt l'addition.
7	»	»	»	32 »	35	0,62	0,00	»	»	»	0,62	Coagulation.
8	»	»	»	9,5	»	0,42	0,00	»	»	»	0,42	»

On aperçoit le fait curieux que la levure séchée à 15 degrés et macérée 4 h. 1/2 à 25 degrés a donné du suc qui fermentait faiblement (0,33 grammes de CO^2) ; macérée au contraire à 35 degrés, elle a donné du suc qui fermentait normalement (1,36 gr. de CO^2 sur 8 grammes de sucre).

Pour mieux faire ressortir l'influence de la dessiccation, de la température et de la durée de la macération sur l'activité du suc, je vais décrire les expériences qui se trouvent réunies dans les tableaux suivants :

Exp. XVI. — La levure Moritz du 20 janvier. Concentration du sucre 32 p. 100, 20 cent. cubes de suc pour chaque fiole et 0,2 cent. cubes de toluène. La fermentation a eu lieu à 25 degrés. Une partie de levure pour trois d'eau.

Nos	DESSICCATION — degrés.	MACÉRATION		GRAMMES CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2.
		degrés.	heures.	1	2	3	4	5	6	
1	25	35	1	0,88	0,49	0,31	—	0,10	0,00	1,78
2	»	»	2	1,40	0,53	0,24	0,10	0,05	0,01	2,33
3	»	»	3	1,19	0,38	0,18	0,06	0,02	0,00	1,83
4	»	»	4	1,15	0,36	0,16	—	0,07	0,00	1,74
5	»	25	6	1,26	0,38	0,18	0,06	0,01	0,00	1,89
6	35	35	2	1,34	0,55	0,22	0,09	0,02	0,00	2,22
7	»	»	4	1,20	0,31	0,10	0,02	0,00	0,00	1,63
8	»	»	6	1,09	0,36	0,17	0,01	0,00	0,00	1,63
9	»	25	6	1,61	0,51	0,12	0,04	0,00	0,00	2,28

Exp. XVII. — La levure à bocks de Moritz. Mêmes conditions que dans l'expérience XVI. Pour les numéros 6, 7 et 8 on a pris une partie de levure pour deux et demi d'eau. Le suc a commencé à fermenter aussitôt l'addition du sucre. Le suc dn n° 6 contenait 18,95 p. 100 de résidu sec, et celui du n° 8, 19,05.

N^os	DESSICCATION degrés.	MACÉRATION		GRAMMES CO^2 PAR JOUR								GRAMMES CO^2
		degrés	heures	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	15	35	2	0,06	0.02	0,00	»	»	»	»	»	0.08
2	»	25	6	0.60	0.08	0.00	»	»	»	»	»	0,68
3	25	35	1 1/2	0,66	0.29	0,13	0.04	0.00	»	»	»	1.12
4	»	»	2	0.92	0,44	0.19	0,09	0,01	0.00	»	»	1.65
5	»	»	2 1/2	0,84	0,42	0,20	0.08	0,02	0.00	»	»	1,56
6	»	»	2 1/2	1,25	0.53	0.18	—	—	—	0,08	0.00	2.04
7	»	»	2	1,21	0.53	0.26	0.13	—	—	—	0.06	2.19
8	»	25	6	1.69	0.56	—	—	—	0,10	0,00	»	2,35
9	35	35	2	1.31	—	0.62	0.05	0.00	»	»	»	1.98

Exp. XIII. — On a mélangé 10 cent. cubes de suc du n° 1 avec 10 cent. cubes de celui du n° 7 (Expérience XVII) non bouilli (n° 1) et bouilli (n° 2), du tableau ci-dessous), on a ajouté 8 grammes de sucre avec 0,2 cent. cubes de toluène pour chaque fiole. Le tableau suivant montre la marche de la fermentation dans les deux cas.

N^os	GRAMMES DE CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2
	1	2	3	4	7	8	
1	0,82	0.45	0,21	0,10	0,02	0,00	1,60
2	0,70	0,36	0,17	0,01	0,00	»	1,29

On constate que la levure séchée à la température ordinaire donne du suc très pauvre en coenzyme ; si l'on mélange le suc peu actif avec du suc actif après l'avoir fait bouillir, celui-là devient à son tour bien actif, c'est-à-dire que l'inactivité du suc ne dépend pas ordinairement de l'absence de la zymase, mais de la coenzyme. Il y a d'ailleurs des exceptions, comme on verra plus loin, la levure dite « parisienne » ne donnant pas de suc actif, même si on le mélange avec du suc très actif préalablement bouilli.

EXP. XIX. — Levure de Munich du 3 février. Cette levure, après avoir été séchée par Schroder pendant 4 heures à 30-35 degrés, m'a été envoyée encore humide; bien qu'elle ait supporté un transport par chemin de fer pendant 2 jours, elle a donné après sa dessiccation complète un suc très actif.

NUMÉROS	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION	DESSICCATION	MACÉRATION		GRAMMES CO^2 PAR JOUR						GRAMMES CO^2
				degrés.	heures.	1	2	3	4	5	6	
1	20	32	35	35	2	1,68	0.53	—	0,12	0,00	»	2.33
2	»	»	25	35	2	1,88	0.42	0,11	»	0,06	0.00	2.47
3	»	»	25	35	2	1,33	0,66	—	0,42	0,06	0,00	2,47
4	»	»	35	35	2	1,83	0.38	0,09	0,02	0,00	»	2,32
5	»	»	25	25	6	1.45	0,62	—	0,37	0,05	0,00	2.49
6	»	9.5	25	25	2	0.78	0.04	—	0,03	0,00	»	0.85

La levure a été macérée avec 3 parties d'eau à l'exception du n° 4. Pour cette expérience j'ai fait macérer 100 grammes de levure avec 100 grammes d'eau; néanmoins on voit que la quantité d'acide carbonique dégagée a été égale à celle du n° 1, c'est-à-dire 2,32 et 2,33 grammes, bien que le suc fût beaucoup plus concentré. La fermentation était excessivement rapide, mais elle s'arrêta à cause de la coagulation des albuminoïdes (1). Le suc de levure à bock commençait à fermenter aussitôt l'addition du sucre, celui de la levure de Munich après une heure. La levure macérée 6 heures à 25 degrés donnait le suc qui commençait ordinairement à faire fermenter le sucre plus tôt que celle macérée 2 heures à 35 degrés.

Pour faciliter l'aperçu des expériences décrites ci-dessus, dont le but était de préciser l'influence de la dessiccation, de la durée et de la température de la macération sur l'activité du suc, je joins le tableau suivant dans lequel sont réunies les données expérimentales qui m'ont conduit à la formule de la préparation du suc que j'ai donnée dans les séances de la Société chimique de France des 27 janvier et 24 mars 1911.

(1) Voir aussi mon mémoire : La zymase est-elle une diastase? Ces *Annales*, n° 9, p. 682, 1911.

NUMÉROS	CONCENTRATION p. 100.	DESSICCATION en degrés.	DILUTION	MACÉRATION		DURÉE de filtration (1), en heures.	DURÉE de fermentation. en jours.	GRAMMES CO^2 pour 20 cc. de sucre.	GRAMMES CO^2 — Durée.
				heures.	degrés.				
1	32	15	1 : 3	4 1/2	25	—	—	0	0
2	»	»	»	»	»	16	2	0,14	0,07
3	»	»	»	»	»	—	1	0,33	0,33
4	»	»	»	»	»	16	2	0,49	0,25
5	»	»	»	»	»	—	1	0,33	0,33
6	9,5	»	»	»	»	—	3	0,71	0,27
7	32	»	»	6	»	—	2	0,68	0,34
8	»	»	»	2	35	—	5	0,76	0,15
9	»	»	»	»	»	—	5	1,36	0,27
10	9,5	»	»	»	»	—	3	0,74	0,25
11	32	»	»	»	»	—	2	0.08	0,04
12	»	25	»	24	0	—	2	1,08	0,54
13	»	»	»	24	3	—	6	1,99	0,33
14	»	»	»	»	»	24	2	0.56	0.28
15	»	»	»	»	15	—	5	1,79	0,36
16	9,5	»	»	»	25	—	4	0,85	0,21
17	32	»	»	»	»	—	7	1,82	0,26
18	»	»	»	»	»	17	5	1,16	0,23
19	»	»	»	4 1/2	»	—	6	2.27	0,38
20	»	»	»	»	»	16	4	1.44	0,38
21	»	»	»	»	»	—	6	2,50	0,42
22	»	»	»	»	»	16	4	1,48	0,37
23	»	»	»	5	»	—	5	1,24	0,25
24	»	»	»	6	»	—	6	2,63	0.44
25	»	»	»	»	»	17	5	1.64	0.33
26	»	»	»	»	»	—	5	1.45	0,29
27	»	»	»	»	»	—	5	1,89	0,38
28	»	»	1 : 2 1/2	»	»	—	6	2,35	0,39
29	»	»	1 : 3	»	»	—	5	2,49	0,50
30	»	»	»	7	»	—	5	1,35	0,27
31	»	»	»	19	»	—	2	0,92	0,46
32	»	»	»	1	35	—	5	1,78	0,36
33	»	»	»	1 1/2	»	—	4	1,12	0,35
34	»	»	»	»	»	—	7	1,35	0,19
35	»	»	1 : 3	»	»	—	6	2,33	0,39
36	»	»	»	»	»	—	5	1,65	0,33
37	»	»	1 : 2 1/2	»	»	—	8	2,19	0,27
38	»	»	1 : 3	»	»	—	5	2,47	0,49
39	»	»	»	»	»	—	»	2,47	0,49
40	»	»	»	2 1/2	»	—	»	1.56	0,31
41	»	»	1 : 2 1/2	»	»	—	7	2,04	0,29
42	»	»	1 : 3	3	»	—	5	1,83	0,37
43	»	»	»	4	»	—	»	1,74	0,35
44	»	35	»	4 1/2	25	—	7	1.91	0,27
45	»	»	»	»	»	16	3	0.79	0.26
46	»	»	»	»	»	—	6	2,17	0,36
47	»	»	»	»	»	16	3	0,89	0,30
48	»	»	»	6	»	—	4	2,28	0,57
49	»	»	»	2	35	—	5	2,22	0,44
50	»	»	1 : 2	»	»	—	4	1,98	0,50
51	»	»	1 : 3	»	»	—	»	2,33	0,58
52	»	»	»	»	»	—	»	2,32	0,58
53	»	»	»	4	»	—	»	1,63	0,41
54	»	»	»	6	»	—	»	1,63	0,41

(1) La durée moyenne de filtration était égale à 1 heure à peu près pour toutes les expériences à l'exception des numéros 2, 4, 14, 18, 20, 22, 25, 45 et 47.

Un regard sur le tableau ci-contre suffit pour voir que l'activité du suc de macération dépend avant tout de la température de dessiccation, de la durée et de la température de la macération (sans parler de l'influence de la race et de l'état de levure, ces deux facteurs ayant la même influence sur l'activité du suc, qu'il soit obtenu d'après la méthode de Buchner ou d'après la mienne).

La durée de la dessiccation joue aussi un certain rôle, mais toutefois il est beaucoup moins important que celui de la température, parce que la levure desséchée à 15 degrés, en deux jours, donne tout de même le suc inactif, tandis que la même levure desséchée en deux jours à 25-35 degrés le livre actif.

On observe aussi qu'en macérant à 25 degrés pendant 6 heures on obtient une très bonne activité, mais il est préférable de macérer à 35 degrés parce qu'on gagne beaucoup de temps, ce qui a, pour certaines expériences, une grande importance.

L'influence extrêmement favorable de la dessiccation à une certaine température sur l'activité de la levure donne lieu de penser à l'existence de la *prozymase*.

Telles sont les conditions qui permettent d'obtenir le maximum d'activité, dans le temps le plus court possible, et qui m'ont conduit à donner la formule courte, précise et pratique que voici : *Dessécher la levure à 25-30 degrés, faire macérer ensuite avec 3 parties d'eau à 35 degrés pendant 2 heures.*

Ces expériences montrent aussi que l'on peut sécher la levure à 35 degrés; si l'on perd un peu en activité (d'ailleurs pas toujours), on gagne en temps de préparation. Si l'épaisseur de la couche ne dépasse pas 1 cent. 1/2, on obtient la levure sèche en 24 heures. On pourrait aussi commencer à sécher la levure à 40 et 45 degrés, comme je le pratiquais en me servant de la méthode de Buchner (voir plus haut), et finir à 25 degrés ou même à la température ordinaire, mais la chose la plus simple, c'est d'employer la levure sèche de Munich qui est très bien lavée, — circonstance qui dans certains cas n'est pas sans importance, — et donne toujours du suc très actif.

Aussi était-il intéressant de voir s'il existait un rapport entre le résidu sec et le pouvoir fermentatif du suc. Pour doser le résidu sec on a pris chaque fois 10 cent. cubes de suc et on les a séchés à 100 degrés jusqu'à poids constant.

Exp. XX. — Levure de Munich du 28 janvier macérée avec 3 parties d'eau. La même levure fraîche traitée d'après le procédé de Buchner et Hahn (n[os] 5 et 6) a donné le suc presque inactif (résidu sec 9,77 p. 100).

NUMÉROS	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION	DESSICCATION	MACÉRATION		GRAMMES DE SUCRE par jour.				GRAMMES CO^2.	RÉSIDU sec p. 100.
				degrés.	heures.	1	2	6	7		
1	20	32	35	35	2	0,18	0,15	0,07	0,00	0,40	13,45
2	»	»	25	»	»	0,53	0,17	0,09	0,00	0,79	15,73
3	»	»	15	»	»	0,02	0,00	»	»	0,02	5,82
4	»	9,5	15	»	»	0,03	0,00	»	»	0,03	5,82
5	»	9,5	—	»	»	0,04	0,02	0,01	0,00	0,07	9,77
6	»	32	—	»	»	0,05	0,02	0,01	0,00	0,08	9,77

Exp. XXI. — Levure de Moritz du 14 février macérée avec 3 parties d'eau.

NUMÉROS	C. CUBES DE SUC	CONCENTRATION	DESSICCATION	MACÉRATION		GRAMMES DE SUCRE par jour.				RÉSIDU SEC p. 100.	REMARQUES
				degrés.	heures.	1	3	4	Gr. CO^2.		
1	20	32	—	—	—	0.29	0.05	0.00	0,34	15,61	D'après la méthode de Buchner. A commencé à fermenter de suite.
2	»	9,5	—	—	—	0,21	0,11	0,00	0,33	»	
3	»	32	15	35	2	0.03	0,02	0,00	0.05	6,09	A commencé après quelques heures.
4	»	»	25	»	»	0.79	0.18	0.00	0,97	17,21	De suite.
5	»	»	35	»	»	0.17	0.00	0,00	0.17	13,88	Quelques heures après.

Exp. XXII. — La levure de Munich du 15 février macérée avec 3 parties

NUMÉROS	CENT. CUBES de suc.	CONCENTRATION	MACÉRATION		GRAMMES CO^2 par jour.					GRAMMES CO^2.	RÉSIDU sec p. 100.
			degrés.	heures.	1	5	8	11	12		
1	20	32	35	3	1,11	0,87	0,32	0,12	0,00	2,42	15.08
2	»	»	25	6	1,14	0,80	0,23	0,03	0,00	2,42	15.02

d'eau à 35 degrès pendant 2 heures, et à 25 degrés pendant 6 heures, a donné des sucs tout à fait comparables.

Voici les expériences que j'ai faites pour voir comment se comporte le résidu sec si l'on modifie la température ou la durée de la macération ou enfin la dilution.

Exp XXIII, *a* et *b*). — Levure de Munich du 28 février.

A				B					
NUMÉROS	MACÉRATION degrés.	MACÉRATION heures.	RÉSIDU sec p. 100.	NUMÉROS	DILUTION	MACÉRATION degrés.	MACÉRATION heures.	RÉSIDU sec. p. 100.	GRAMMES CO^2.
1	35	2	8,07	1	1 : 2/2	35	2	10,98	1,86
2	35	5	12,02	2	1 : 3	»	»	8,66	1,44
3	4	20	12,23	3	1 : 4	»	»	6,08	0,64
4	15	20	11,57	4	1 : 5	»	»	2,07	0,59
5	35	20	19,49	5	1 : 6	»	»	1,30	0,37
				6	1 : 6	»	3	5,40	0,30

Dans l'expérience XXIII *b* on a fait macérer la même levure avec 2 1/2, 3, 4, 5 et 6 parties d'eau. Il est évident *a priori* que plus on ajoute d'eau, plus le suc perd de son activité.

Exp. XXIV. — La levure du 3 février mélangée avec 3 parties d'eau.

	Résidu sec.
N° 1. Filtré de suite . . . . :	7,24 p. 100
N° 2. Après 1 heure à 15 degrés	8,37 —
N° 3. Après 1 heure à 15 degrés	8,62 —
N° 4. Après 2 heures à 35 degrés	10,00 —
N° 5. Après 3 heures à 35 degrés	13,02 —
N° 6. Après 4 heures à 35 degrés	14,33 —

Les expériences suivantes rendent compte de l'influence de la durée de filtration.

Exp. XXV, *a* et *b*). — Levure de Munich du 20 février, macérée avec 3 parties d'eau à 35 degrés pendant 2 h. 1/2.

A. — **Filtré de suite.**								B. — **Filtré après 24 heures.**							
C. C. DE SUC	CONCENTRATION	GRAMMES CO^2 par jour.					GRAMMES CO^2	C. C. DE SUC	CONCENTRATION	GRAMMES CO^2 par jour.					GRAMMES CO^2
		1	4	5	8	9				1	4	5	8	9	
20	32	1,68	0,53	0,13	0,05	0,00	2,39	20	32	0,03	0,76	0,48	0,42	0.00	1,69

Le même suc ayant été laissé sans contact avec la levure pendant 24 heures à la température ordinaire ne fermentait plus, c'est-à-dire que *le contact du suc avec la levure est favorable à la conservation de l'activité du suc.* Il reste à éclaircir la cause de ce fait curieux.

La durée de la macération a une influence plus grande sur l'activité du suc que sur la quantité de résidu sec, surtout si elle est faite à une température élevée, et cela se comprend parce que, si celle-ci favorise la macération, elle favorise aussi la destruction de la coenzyme par une diastase (1).

Pour étudier l'influence de la race j'ai fait quelques expériences avec de la levure haute, dite parisienne, en la traitant d'après la méthode de Buchner et Hahn et d'après la mienne, mais le suc obtenu restait inactif, quoique la levure fraîche aussi bien que desséchée fassent fermenter vigoureusement le sucre. Pour en éclaircir la cause, j'ai essayé d'ajouter au suc du phosphate de soude, de le mélanger à parties égales avec du suc très actif, mais bouilli, d'une autre levure, de rajeunir la levure même d'après le procédé de Hayduck, de la laisser immergée sous l'eau pendant 24 heures à 0°, mais tous ces efforts restaient vains, le suc était toujours inactif.

Si l'on dilue avec du suc bouilli de la levure « parisienne »

(1) *Loc. cit.*

le suc actif d'une autre levure, celui-là se comporte comme s'il s'agissait d'eau pure. Il est clair que non seulement le suc de levure « parisienne » ne contient pas de zymase, mais qu'il est aussi *privé de coenzyme sous forme organique*.

Exp. XXVI. — 10 cent. cubes de suc de levure de Moritz (séchée à la température ordinaire), dont le pouvoir fermentatif était 0,76, ont été mélangés avec 10 cent. cubes d'eau (fiole A) et avec 10 cent. cubes de suc bouilli de levure parisienne (fiole B) ; dans les deux cas aucune fermentation du sucre qu'on a ajouté (8 grammes par fiole) ne s'était produite.

La levure haute de Springer du 28 janvier a donné du suc qui faisait fermenter le sucre, mais très faiblement : 0,12 gr. de CO^2 pour 8 grammes de sucre et 20 cent. cubes de suc en 3 jours. Le suc contenait 8,85 p. 100 de résidu sec. Un mélange à parties égales du suc de levure parisienne avec celui de levure de Springer, qui contenait 9,42 p. 100 de résidu sec, ne fermentait pas le sucre non plus.

Dans une autre expérience, le suc de levure Springer était tout à fait inactif (résidu sec 7,5 p. 100) même concentré par congélation (r. s. 12 p. 100). Cette propriété de la levure haute, de ne pas donner un suc actif, est énigmatique et, pour le moment, j'éprouve de la difficulté à donner une explication plus ou moins plausible, mais je me propose de continuer l'étude de ce fait curieux dans l'espoir de l'éclaircir enfin.

De toutes les expériences décrites plus haut il se dégage pleinement le rôle que jouent, dans l'activité du suc de macération, les facteurs tels que :

1° température de la dessiccation de la levure ;

2° température et durée de la macération (le dernier facteur est une fonction du premier et le rapport entre eux peut être exprimé par $t' = f(t^{4}_{0})$;

3° conservation du suc seul ou avec de la levure ;

4° degré de la dilution et 5° état et race de la levure, ces deux facteurs étant d'ailleurs, comme je l'ai dit plus haut, communs pour l'activité du suc de macération et celui du broyage.

Influence de la température sur le pouvoir fermentatif du suc.

Exp. XXVII. — Levure sèche de Munich du 15 mars, macérée 2 heures à 35 degrés. Pour 20 cent. cubes de suc, 8 grammes de sucre et 0,2 cent. cubes de toluène.

Nos	Tempér. — degrés.	Grammes de CO^2 par jour										Durée	Grammes CO^2	Grammes CO^2 / durée.
		1	2	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	15	0,70	0,60	0,85	0,27	0,20	0,11	0,09	0,06	0,03	0,01	12	2,92	0,24
2	25	1,19	0,71	0,44	0,10	0,05	0,02	»	»	»	»	7	2,51	0,31
3	30	1,45	0,47	0,10	0,02	0,00	»	»	»	»	»	5	2,04	0,40
4	35	1,45	0,16	0,01	0,00	»	»	»	»	»	0	2	1,62	0,81

Cette expérience typique suffit (j'en ai fait plusieurs qui ont donné le même résultat) pour montrer que le suc de macération se comporte de la même façon que le suc de broyage (1) : plus la température est élevée, plus la fermentation devient rapide et moins d'acide carbonique est produit à cause de la coagulation des albuminoides et de la décomposition de la coenzyme organique (et non de la destruction de la zymase par l'endotryptase) (2).

Propriétés du suc de macération.

La couleur du suc de macération est plus foncée que celle du suc de broyage. Il est limpide parce qu'il ne contient pas de glycogène, ni de terre d'infusoire, qui donnent au suc de broyage un aspect fort opalescent. L'absence de glycogène est la cause que le suc de macération, abandonné sans addition de sucre, ne montre presque aucune autofermentation, propriété bien avantageuse dans certains cas. Le suc a un goût spécifique désagréable qui est dû à la présence de l'éther du sucre avec l'acide phosphorique. Selon le schéma de la fermentation alcoo-

(1) *Die Zymasegärung*, 1903, p; 145-148.
(2) *Loc. cit.*, p. 149.

lique que j'ai donné (1), l'éther phosphoré qui se forme par condensation devrait avoir la formule : ($CH^2H^2PO^4(CHOH)^3$ $CO\,CH^2H^2PO^4$); c'est-à-dire qu'à cause de ce fait que l'acide phosphorique est lié à l'atome du carbone qui se trouve près du groupement CO, l'hétose, probablement, un acrose, perd complètement le goût sucré et, en échange, donne le goût dont je viens de parler.

Le résidu sec obtenu après la macération pendant 2 heures à 35 degrés, ou 6 heures à 25 degrés, avec 3 parties d'eau, oscille entre 10 et 19 p. 100 selon la levure, mais le plus souvent il est de 15-16 p. 100.

Le résidu sec du suc de broyage (2) oscille entre 9 et 15 p. 100, moyenne 13 p. 100, c'est-à-dire que mon suc est plus riche en matières extractives que le suc Buchner. La quantité des albuminoïdes coagulables oscille, pour la levure de bière, entre 2 et 7 p. 100; la moyenne se trouve entre 4 et 6 p. 100. Aussi le suc de broyage semble-t-il un peu plus riche en matières albuminoïdes coagulables, comme on peut en juger d'après les données publiées par Buchner et Hahn (3). Je n'ai pas fait d'expériences comparatives sur ce sujet.

La coagulation commence à 45 degrés, et plus la température monte, plus la masse se solidifie en se transformant peu à peu en gelée. Si l'on fait cette expérience dans un tube à essais, la coagulation consommée, on peut le renverser sans qu'une goutte ne s'écoule.

Teneur en diastases. Endotryptase.

Il va de soi que le suc de macération contient toutes les enzymes qui se trouvent dans le suc de broyage, comme sucrase, maltase, réductase, catalase, etc. (4). Je ne ferai con-

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, séance du 10 juillet 1911.
(2) *Loc. cit.*, p. 75.
(3) *Loc. cit.*, p. 74 et 292.
(4) D'après une communication orale faite par M. Eugène Wollmann le suc préparé par mon procédé possède un pouvoir antiprotéolytique extrêmement marqué; ce pouvoir est surtout accentué vis-à-vis de la pepsine, mais existe également, quoique à un moindre degré, vis-à-vis de la trypsine. Il y a en cela concordance parfaite avec les données de Buchner et Hahn (*Biochem. Zeitsch.*, t. XXVI, p. 171, 1910).
C'est ainsi que le blanc d'œuf mis en tubes de 1 cent. 5 de longueur est

naître ici que quelques-unes des expériences que j'ai faites sur l'endotryptase de Hahn (1), qui joue un rôle si important dans les transformations que subit le suc et peut-être dans la macération même. S'il est abandonné à la température ordinaire sans addition de sucre, un dépôt des albuminoïdes apparaît le deuxième ou le troisième jour. A 35 degrés le dépôt peut se former déjà en quelques heures, surtout avec du suc de la levure de Munich. Peu à peu le dépôt disparaît en se liquéfiant sous l'action de l'endotryptase.

Ainsi on peut toujours observer deux phases : l'apparition du coagulum et sa disparition progressive. Il est fort probable que la première phase du phénomène est due à la présence de la présure, comme le montre l'expérience suivante.

Exp. XXVIII. — J'ai pris deux matras (A et B) avec du lait (100 cent. cubes dans chacun), j'y ai ajouté une forte quantité de toluène et à l'un d'eux (A), en outre, 5 cent. cubes de suc de la levure de Munich. Ensuite je les ai mis au thermostat à 35 degrés. En l'espace d'une nuit, le lait en expérience dans le matras A était complètement coagulé, tandis qu'il restait tel dans le matras témoin B.

Deuxième phase. — La dissolution du coagulum sous l'action de l'endotryptase a été suivie par la méthode de Mett modifiée (2), qui a été à son tour contrôlée par le dosage indirect des albuminoïdes coagulables. Je décrirai ici brièvement quelques expériences faites en vue d'établir le rapport quelconque pouvant exister entre l'activité du suc et ses propriétés endotryptiques.

Méthode.

On a pris des petits tubes à essais (A), d'un diamètre ne dépassant pas 1 centimètre, et on les a remplis avec de la gélatine thymolysée. Ces tubes, la gélatine étant solidifiée, ont été

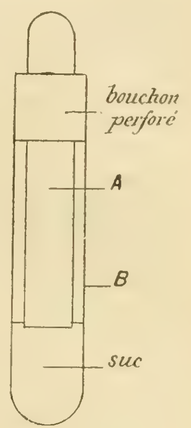
liquéfié à une longueur de 1 centimètre dans les tubes où la solution de pepsine (à 4 p. 100) est diluée de solution de NaCl à 0,9 p. 100, au bout de 5-6 jours. Dans les tubes où cette solution est diluée de suc bouilli il n'y a pas d'attaque perceptible. Pour la trypsine l'action est de moitié plus faible en présence de suc bouilli.

(1) *Loc. cit.*, p. 287.

(2) Franz Furmann, *Vorlesungen über Bakterienenzyme*, 1907, p. 25.

mis dans le sens inverse dans des tubes à essai d'un diamètre plus grand (B), qui contenaient du suc à essayer sur son activité endotryptique, comme le montre le dessin schématique ci-dessous :

Le dosage indirect des matières albuminoïdes a été fait de la manière suivante. Avant l'expérience on a dosé le résidu sec avec du suc, en en séchant à 100 degrés 10 cent. cubes jusqu'à poids constant; d'autre part, on a pris 50 cent. cubes de suc et on les a fait coaguler dans l'eau bouillante dans un matras bouché.



Après refroidissement on les a filtrés et on a dosé le résidu sec comme ci-dessus. On mettait au thermostat pendant 24 heures à 35 degrés quelques dizaines de centimètres cubes du même suc et l'on dosait, après la coagulation, le résidu sec.

Ce procédé, bien qu'il ne soit pas rigoureusement exact, se recommande par sa rapidité et la simplicité de l'exécution.

Exp. XXIX.

LEVURE DE	POUVOIR fermentatif.	RÉSIDU SEC p. 100.	ALBUMINOÏDES coagulables.	ALBUMINOÏDES coagulables après 24 heures.	P. 100 des albuminoïdes digérées.	MILLIMÈTRES de gélatine liquéfiée à 30°.
Munich du 28 février	1,44	8,7	1,56	1,16	25,6	1 1/2
Munich du 15 mars.	2,26	17,03	6,89	2,04	70,4	3 1/2
Moritz du 10 janvier séchée à 15°.	0 »	19,77	2,65	0,75	71,7	3 1/2
Moritz du 14 février séchée à 35°.	0,17	14,44	4,90	0,50	85,7	4 1/2
Springer du 4 février	0 »	6,76	0,39	0,07	82,1	2 1/2

La première colonne montre la quantité de CO^2 dégagé par 20 cent. cubes de suc employé plus 8 grammes de sucre, c'est-à-dire son activité (Gärkraft); la deuxième, les p. 100 du résidu sec; la troisième, la quantité des albuminoïdes coagu-

lables qui ont été dosées après le séjour au thermostat pendant vingt-quatre heures à 35 degrés; la quatrième, les p. 100 des albuminoïdes digérées en vingt-quatre heures; enfin, la cinquième montre l'épaisseur de la couche de gélatine liquéfiée dans les tubes.

Bien que trois mois se soient écoulés entre les deux dosages de résidu sec, les chiffres obtenus ne diffèrent que très peu entre eux, comme le montre l'expérience suivante :

Exp. XXX.

		1er dosage.	2e dosage.
Springer du 4 février . . .	Résidu sec :	7,5	6,75
Moritz du 14 février	Résidu sec :	13,88	14,44
Munich du 28 février	Résidu sec :	8,66	8,70

Ce fait parle en faveur de la méthode indirecte du dosage des albuminoïdes coagulables, pour éviter le lavage ennuyeux du coagulum qui est nécessaire si on le pèse directement.

Il ressort de l'expérience XXIX, pour laquelle j'ai choisi exprès des sucs très différents, qu'il n'y a pas un rapport direct entre le résidu sec, la teneur en endotryptase et l'activité du suc.

La levure de Munich du 28 février a livré le suc anormal sous tous rapports. Elle n'était pas préparée suivant mes indications et probablement elle avait été séchée à une température inférieure à 25 degrés, parce que, pendant la macération même, elle fermentait si vivement qu'elle débordait de la capsule.

Si le suc est laissé sans addition de sucre à la température ordinaire, il se forme en deux ou trois jours un dépôt cristallin soluble dans l'acide acétique. Ce dépôt consiste en des phosphates de calcium et de magnésium (1) (en moyenne, 0,3 grammes p. 100 cent. cubes). A la surface du liquide, une couche graisseuse apparaît. J'ai constaté que ce dépôt ne provient pas de la décomposition par l'endotryptase des albuminoïdes coagulables, j'ai même pu séparer de la zymase la dias-

(1) La présence du calcium a été constatée par l'oxalate d'ammonium; celle de l'acide phosphorique par le molybdéate d'ammoniaque. Si l'on ajoute de l'ammoniaque à la solution de ce dépôt dans l'acide acétique, on peut observer au microscope les cristaux caractéristiques du phosphate ammoniaco-magnésien.

tase qui le produit aussi dans le suc bouilli. Cette diastase est toujours accompagnée de la catalase. De plus, j'ai pu voir que celle-là détruit la propriété régénératrice du suc bouilli, c'est à dire sa coenzyme sous forme organique. L'étude de la nature de cette curieuse diastase, ainsi que de la coenzyme même, fera l'objet d'une communication ultérieure. Plus tard, en une semaine environ, apparaissent les cristaux sphériques, grands, bien développés de tyrosine. Je n'ai pas fait l'étude aussi détaillée des produits de la digestion endotryptasique des albuminoïdes du suc de macération, comme Hahn et Geret (1) l'ont fait pour le suc de broyage, mais je ne crois pas qu'il y ait, sous ce rapport, une différence quelconque entre les sucs obtenus par des procédés différents. Je crois seulement utile de souligner ici qu'on peut produire à volonté un dépôt de phosphate dans le suc, même bouilli, en y ajoutant un peu de la diastase que j'ai isolée.

Il se pose maintenant la question suivante : quelle est la cause de ce fait que des colloïdes tels que des albuminoïdes sortent de la cellule ? Doit-elle être attribuée exclusivement aux effets des forces osmotiques, ou bien les facteurs d'ordre chimique sont-ils en jeu? On peut bien supposer que l'entrée brusque de l'eau dans la cellule desséchée en fait éclater la membrane, mais l'étude microscopique ne confirme pas cette hypothèse, parce que au début de la macération la plus grande partie des cellules est intacte et se présente sous l'aspect normal. L'influence très marquée de la température et de la durée de la macération sur la quantité du résidu sec et l'activité du suc, fait plutôt admettre l'action chimique directe ou au moyen d'une diastase, d'autant plus que ces deux facteurs, la température et le temps, sont en rapport étroit entre eux, celui-ci étant fonction de celle-là. Or, on obtient le même effet si l'on fait macérer deux heures à 35 degrés, ou six heures à 25 degrés, c'est-à-dire qu'une élévation de 10 degrés de température accélère l'effet produit de trois fois, mais c'est justement la règle généralement admise pour les réactions chimiques! D'autre part, plus la macération dure, plus on observe au microscope les cellules altérées et disloquées ainsi que leurs débris. En outre, j'ai pu constater, en me ser-

(1) *Die Zymasegærung*, p. 293.

vant de la méthode de coloration de Schlicht et Winter (1), que la plupart des cellules de levure, séchées à 25-30 degrés, restent encore vivantes.

Tous ces faits, ainsi que les considérations théoriques, me font penser que, d'une part, la dessiccation affaiblit la résistance de la membrane à l'exosmose des colloïdes, en changeant les propriétés physiques de celle-là et que, d'autre part, une diastase existe qui peut dissoudre la membrane et dont l'action devient très intense à 35 degrés. Il n'est pas impossible que cet effet soit produit par l'endotryptase même, la supposition a déjà été faite par Hahn et Geret (2); dans ce cas, on n'est pas obligé d'augmenter sans fin la quantité de diastase se trouvant dans la cellule de levure. Je me propose d'étudier cette question de plus près.

L'élévation de la température accélère aussi la destruction de la coenzyme sous forme organique, le fait a été constaté par Buchner et ses collaborateurs. On voit que deux actions diastasiques différentes vont parallèlement : 1° l'extraction des albuminoïdes, grâce à la dissolution de la membrane ; 2° décomposition de la coenzyme organique. Il est évident qu'à la fin de la deuxième heure ces deux effets se trouvent dans l'état d'un certain équilibre, parce qu'on obtient le maximum d'activité; si l'on continue la macération au delà de cette limite (qui peut varier pour des levures de provenance différentes), le deuxième effet — destruction de la coenzyme — prend le dessus, et l'activité du suc va en décroissant. Il n'est pas impossible qu'à cette température élevée la zymase même soit attaquée à la fin par l'endotryptase et digérée comme les albuminoïdes inactifs qui l'accompagnent. Si les considérations que je viens de développer ici ne sont pour le moment qu'une hypothèse, c'est tout de même une hypothèse qui peut guider les recherches dans cette direction. La méthode de macération qui a donné un si beau résultat avec la levure, peut un jour devenir générale si on l'applique à l'extraction des diastases bactériennes.

(1) *Ann. de la Brasserie et de la Distillerie*, 1910, p. 20.
(2) *Loc. cit.*, p. 333.

Résumé.

En jetant un regard rétrospectif sur les faits et expériences communiqués dans ce mémoire, on parvient à cette conclusion que le suc de macération, convenablement préparé, est toujours beaucoup plus actif que le suc de broyage et lui ressemble sous tous les rapports. En outre, le procédé de macération, sans parler de la simplicité et de la rapidité avec lesquelles on obtient du suc, surtout si l'on se sert de la levure sèche de l'industrie, offre les avantages suivants;

1° Le suc est privé de glycogène;

2° On connaît d'avance, si l'on emploie la même levure, la quantité et l'activité du suc obtenu d'un certain poids de cette levure;

3° La levure séchée conservant longtemps son activité, cette méthode permet d'entreprendre des recherches comparatives, impossibles autrefois.

ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LES DIASTASES

par H. AGULHON

(Travail du laboratoire de M. G. Bertrand).

I. — ACTION DES DIFFÉRENTES RADIATIONS

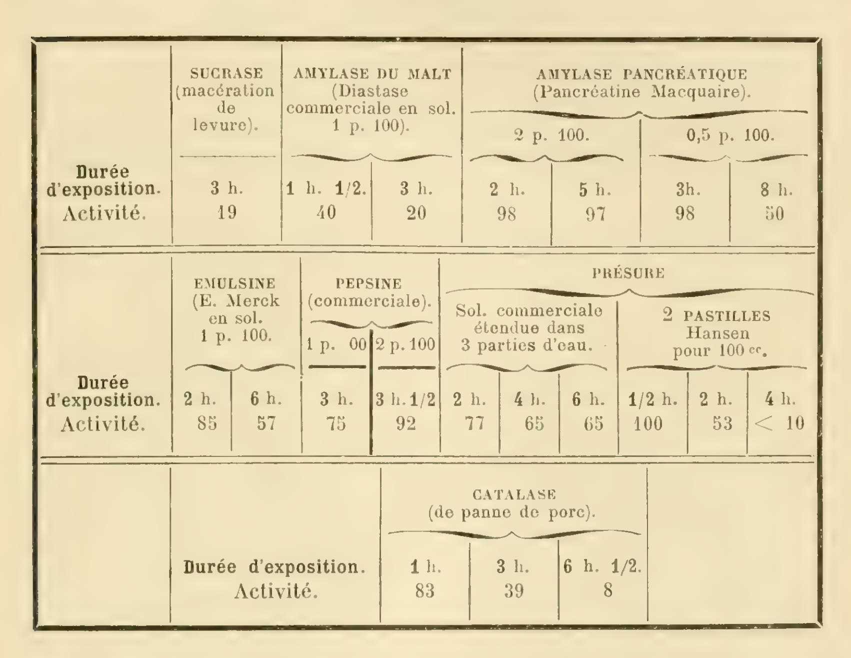
Downes et Blunt, Duclaux, Roux, Fernbach ont étudié l'action de la lumière solaire sur la sucrase, la présure et la toxine diphtérique, mais ils n'ont pas cherché à déterminer la partie active du spectre. Green (1), se servant de la lumière de l'arc électrique, s'est le premier rendu compte de l'action destructrice de l'ultra-violet; son étude porte uniquement sur la diastase du malt et la salive. En 1904, Hertel (2) a noté l'atténuation de la toxine diphtérique et de quelques diastases (amylase, trypsine, présure) sous l'influence de l'éclairement par une raie bien caractérisée du magnésium appartenant à l'ultra-violet (2800 à 2750 UA). Plus récemment, M[lle] Cernovodeanu et V. Henri (3), Baroni et Jonesco-Mihaiesti (4) ont observé la destruction de certaines toxines et des propriétés de certains sérums préparés sous l'action des sources intenses d'ultra-violet que l'on possède actuellement.

Il m'a paru intéressant d'étendre ces récentes études aux solutions diastasiques et d'apporter ainsi un complément aux travaux de Green et de Hertel.

1° *Action des rayons ultra-violets.* — Je me suis servi dans ces expériences d'une lampe à mercure Heræus en quartz fondu prenant 3 ampères sur 110 volts. Les solutions diastasiques étaient exposées à une distance de 15 à 20 centimètres de cette source lumineuse dans des tubes à essai en quartz et en verre de 16 millimètres de diamètre et d'une épaisseur de 1 millimètre environ, suffisante pour arrêter dans les tubes de verre les

(1) *Phil. trans. of the R. Society*, 1897, p. 167.
(2) *Zeitsch. f. allgem. Physiol.*, t. IV, p. 1 à 43, 1904.
(3) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. CXLIX, p. 365, et t. CLI, p. 724.
(4) *Comptes rendus Soc. de Biologie*, t. LXVIII, p. 393, et t. LXIX, p. 227, 1910.

radiations inférieures à 3022 $\mu\mu$ (Mlle Cernovodeanu et V. Henri). Après le temps d'exposition désiré, les solutions diastasiques étaient mises en contact avec les substances qu'elles sont susceptibles d'attaquer. Des dosages de ces substances permettaient de se rendre compte de l'activité des préparations. *Si l'on représente l'activité de la solution diastasique exposée dans un tube de verre par le chiffre 100, les nombres du tableau suivant expriment l'activité de la même solution exposée en même temps dans un tube de quartz.*



	SUCRASE (macération de levure).	AMYLASE DU MALT (Diastase commerciale en sol. 1 p. 100).		AMYLASE PANCRÉATIQUE (Pancréatine Macquaire).			
				2 p. 100.		0,5 p. 100.	
Durée d'exposition.	3 h.	1 h. 1/2.	3 h.	2 h.	5 h.	3h.	8 h.
Activité.	19	40	20	98	97	98	50

	EMULSINE (E. Merck en sol. 1 p. 100.		PEPSINE (commerciale).		PRÉSURE					
			1 p. 00	2 p. 100	Sol. commerciale étendue dans 3 parties d'eau.			2 PASTILLES Hansen pour 100 cc.		
Durée d'exposition.	2 h.	6 h.	3 h.	3 h. 1/2	2 h.	4 h.	6 h.	1/2 h.	2 h.	4 h.
Activité.	85	57	75	92	77	65	65	100	53	< 10

	CATALASE (de panne de porc).		
Durée d'exposition.	1 h.	3 h.	6 h. 1/2.
Activité.	83	39	8

L'examen des chiffres du tableau montre que les *huit préparations diastasiques étudiées sont toutes plus ou moins rapidement atténuées par les radiations que laisse passer le quartz et qu'arrête le verre.* Pour la diastase du malt, nous avons, dans son action sur l'empois d'amidon, une suite d'actions diastasiques; en suivant d'abord les digestions à l'iode et en prenant la viscosité des empois traités, je me suis rendu compte que l'amylopectinase, diastase liquéfiante, et les diastases productrices de dextrines, étaient atténuées comme la diastase productrice du maltose; de plus, la diastase, ayant été exposée sous le quartz, ne forme pas d'amidon rétro-

gradé. L'amylase pancréatique est difficilement attaquée; elle n'est pour ainsi dire pas touchée en solution à 2 p. 100 ; en diminuant la concentration, l'attaque se fait plus facilement; il en est de même pour la pepsine : il faut voir là l'influence protectrice d'une légère coloration de la solution et aussi de la présence d'albumines qui sont opaques pour les rayons ultra-violets (Green et plus récemment Vallet) (1). La présure est aussi protégée par la coloration de ses solutions : une solution de présure commerciale jaune même étendue, est attaquée à activité égale moins rapidement qu'une solution incolore de pastilles de Hansen.

Dans le cas de l'émulsine (émulsine Merck en solution 1 p. 100), un phénomène particulier s'est produit; après un temps très court d'exposition, le liquide du tube de quartz se trouble et précipite de légers flocons; toute la diastase encore active reste dans la solution. Pour la pepsine, la présence de HCl, libre pendant l'exposition, ne paraît pas hâter sa destruction.

2° *Action de la lumière visible.* — La lumière visible a-t-elle une activité? Des tubes entourés de clinquant étaient placés à côté des autres pendant leur exposition. On comparait ensuite leur activité avec les tubes de verre. Pour l'amylase du malt, la pepsine et la présure, l'action des rayons traversant le verre semble nulle; le contenu des tubes entourés de clinquant n'est pas sensiblement plus actif que celui des tubes entourés de verre; pour l'émulsine, la perte d'activité dans le tube de verre après deux heures d'exposition est de 4,2 p. 100, alors qu'elle est déjà de 17 pour 100 dans le tube de quartz; c'est pour la catalase que la perte est la plus importante : après 6 h. et demie d'exposition, le contenu du tube de verre est trois fois moins actif. On voit donc que *l'activité des rayons traversant le verre n'est pas générale; lorsqu'elle existe, elle est infiniment moins importante que celle des rayons ultra-violets.*

La *laccase* et la *tyrosinase* de l'extrait glycériné de Russule sont très lentement attaquées par les rayons ultra-violets lorsque l'extrait est exposé non étendu d'eau (la glycérine est moins perméable que l'eau et la solution est colorée); après six heures

(1) *Comptes rendus Acad. des sciences*, t. CL, p. 632.

d'exposition, on commence seulement à voir une légère différence en faveur du contenu du tube de verre en faisant agir la solution glycérinée sur le gaïacol à 1 p. 100 ; on ne voit aucune différence dans son action sur une solution de tyrosine saturée. Au contraire, dans une solution de cet extrait glycériné dans quatre volumes d'eau, la laccase et la tyrosinase sont notablement atténuées par une exposition de trois heures dans un tube de quartz. La *peroxydiastase* du malt est aussi rapidement attaquée dans les mêmes conditions.

En résumé, les dix diastases étudiées sont toutes atteintes par l'action des radiations ultra-violettes. Les rayons *abiotiques* ne se contentent pas de détruire rapidement les microorganismes, ils n'épargnent aucun des produits actifs de la cellule, toxine ou diastase, pourvu qu'ils se trouvent dans un milieu perméable à ces radiations. Sur les diastases, la partie du spectre supérieure à 3022 UA, est presque inactive. Nous allons maintenant essayer de voir quel peut être le mécanisme de cette action de la lumière sur les diastases.

II. — MÉCANISME DE LA DESTRUCTION PAR LA LUMIÈRE

Roux, avec la toxine diphtérique (1), Fernbach, avec la sucrase (2), ont montré que l'influence destructive des rayons solaires sur les diastases est due à une action simultanée de la lumière et de l'oxygène ; ils sont sans action sur un liquide exposé dans le vide. Hertel (3) rapporte l'atténuation des enzymes à un phénomène de réduction. Il se base sur ce fait que le sang exposé en couche mince cesse de donner le spectre de l'oxyhémoglobine et que les tissus animaux colorés au bleu de méthylène sont décolorés. L'action de la lumière aurait-elle un mécanisme tellement différent suivant que l'on opère dans l'une ou l'autre partie du spectre? En vue d'élucider cette question, je me suis adressé à un certain nombre de préparations diastasiques : sucrase obtenue par macération d'*Aspergillus niger*, émulsine d'amandes Merck, laccase et tyrosinase de la macération glycérinée de *Russula Queletti*.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, p. 629, 1888.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, p. 473, 1889.
(3) *Loc. cit.*

Cinq tubes à essai, dont trois en verre et deux en quartz, contenant une même solution de la diastase à étudier, sont exposés à 15 ou 20 centimètres de la lampe en quartz à vapeur de mercure Heræus; l'un des tubes de verre est entouré de clinquant et sert de témoin; sans être illuminé, il se trouve dans des conditions de température analogues à celles des autres tubes; on fait le vide dans un des tubes de quartz et dans un des tubes de verre restants à l'aide d'une trompe à mercure, en prenant la précaution de faire bouillir le liquide dans le vide pendant quelques instants pour chasser l'oxygène en solution.

Après le temps d'exposition désiré, on fait agir une même quantité du contenu de chaque tube sur une substance appropriée (saccharose à 10 p. 100 en présence de 2 p. 1000 d'acide acétique pour la sucrase, amygdaline à 2 p. 100 dans le cas de l'émulsine). Le sucre réducteur formé est dosé par la méthode de Gabriel Bertrand. Voici quelques chiffres expérimentaux :

	SUCRASE (2 PRÉPARATIONS DIFFÉRENTES) — Sucre réducteur formé en 1 heure à 53 degrés.		ÉMULSINE (2 PRÉPARATIONS DIFFÉRENTES) — Glucose formé en 1 h. 1/2 à température ordinaire.	
	Première préparation	Deuxième préparation	Première préparation	Deuxième préparation
Temps d'exposition	2 heures.	6 heures.	4 heures.	4 h. 1/2.
	Milligr.	Milligr.	Milligr.	Milligr.
Témoin entouré de clinquant	88,2	32,8	372,7	18,3
Tube de verre	86,8	30,95	351,1	18,1
Tube de verre vide	90,1	43,3	356,8	18,3
Tube de quartz	70,1	22,5	183,5	5,0
Tube de quartz vide	75,0	27,8	270,1	12,6

On voit qu'en ce qui concerne la sucrase, conformément à ce qui a déjà été signalé, l'action de la lumière visible est nulle dans le vide; la destruction par la chaleur semble même entravée dans les tubes sans oxygène; les liquides exposés s'échauffent en effet vers 28-30 degrés pendant l'exposition; cela expliquerait les résultats plus élevés trouvés pour le contenu des tubes de verre vides par rapport aux témoins. Pour l'émulsine, la lumière visible ne paraît au contraire pas perdre absolument son activité dans le vide; son action destructrice est seulement atténuée; elle n'est d'ailleurs pas très forte dans les conditions des expériences précédentes, et, pour certaines diastases, j'ai montré dans la première partie de ce travail qu'elle pouvait être nulle.

La laccase et la tyrosinase d'une macération glycérinée de Russule étendue de quatre volumes d'eau sont comme la sucrase inattaquées dans le vide par les rayons visibles; elles sont attaquées en présence d'oxygène.

En considérant les chiffres obtenus avec les solutions d'émulsine et de sucrase exposées dans les tubes de quartz, on voit que dans les tubes vides elles ont perdu une grande partie de leur activité, mais cependant moins qu'en présence d'air. La sucrase, l'émulsine, la laccase et la tyrosinase exposées aux radiations ultra-violettes sont donc attaquées même dans le vide. Il semblerait que pour cette partie du spectre, la présence d'oxygène libre ne soit plus nécessaire; il n'en faut pas conclure qu'il ne s'agit pas d'un phénomène d'oxydation. On sait, d'après de récentes recherches, que l'eau est décomposée par la lumière ultra-violette en eau oxygénée et hydrogène libre (1). Dans le vide, l'hydrogène est simplement mis en liberté; en présence d'oxygène, au contraire, il se combine à ce dernier élément (2) et donne une nouvelle proportion d'eau oxygénée; il se forme donc à l'air une plus grande quantité de ce corps. Or, celui-ci détruit les diastases en les oxydant. Ainsi, après quatre heures de séjour dans l'eau oxygénée à 0,5 p. 100, la laccase et la tyrosinase de la macération de Russule sont entièrement détruites.

Les faits observés avec les quatre diastases étudiées correspondent parfaitement bien avec ce qu'on sait sur la production d'eau oxygénée. On peut résumer le mécanisme de l'action des radiations lumineuses de la façon suivante :

La lumière visible est active sur les diastases (sucrase, laccase, tyrosinase), seulement en présence d'oxygène ; elle agit par oxydation : il y a probablement formation d'eau oxygénée (3), mais seulement en présence d'oxygène libre;

La lumière ultra-violette, plus active, est susceptible de décomposer l'eau, avec formation d'eau oxygénée; aussi détruit-elle les diastases en solution aqueuse, même en l'absence d'oxygène; en sa présence, l'action est encore plus rapide, la formation de

(1) Miroslaw Kernbaum. — *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. CIL, p. 273, 1909.

(2) Tian, Ibid., t. CLII, p. 1012, 1911.

(3) Miroslaw Kernbaum. *Société de Physique*, 7 juillet 1911.

l'eau oxygénée étant plus grande. Il s'agit là encore d'un phénomène d'oxydation.

La présence d'eau, indispensable pour la formation d'eau oxygénée, est nécessaire à l'attaque des diastases par les rayons ultra-violets. Après trois heures d'exposition dans le quartz en solution dans la glycérine à 30 degrés Baumé, la tyrosinase n'est pas attaquée, et je ne pense pas qu'il faille voir là une question d'opacité de la glycérine pour les radiations, comme le croit Vallet (1). J'ai fait à ce sujet l'expérience suivante : deux tubes de quartz de diamètre différent sont enchâssés l'un dans l'autre ; le tube intérieur est rempli de macération glycérinée de Russule étendue d'eau ; l'intervalle entre les deux tubes est rempli soit de glycérine, soit d'eau ; la lumière est de la sorte obligée, avant d'arriver à la solution diastasique, de traverser un écran d'eau ou de glycérine épais de 4 millimètres. Après trois heures d'exposition, la diastase (tyrosinase) a été détruite de façon sensiblement équivalente par la lumière ayant traversé l'une ou l'autre couche de liquide.

On sait que l'eau oxygénée est détruite presque au fur et à mesure de sa formation sous l'action de l'ultra-violet; si elle se trouve en présence d'une substance oxydable, comme une diastase, elle l'oxyde, et une nouvelle quantité s'en forme, mais la quantité présente en un même moment dans l'eau ne peut pas être considérable. C'est ce qui explique que l'eau exposée aux rayons ultra-violets n'agit pas, ou très faiblement, sur les diastases que l'on y dissout après son exposition.

De l'eau distillée, exposée à 15 centimètres de la lampe dans un tube de quartz, pendant six heures, est mise en présence d'émulsine (1 cent. cube de solution à 2 p. 100 dans 5 cent. cubes d'eau exposée); un tube témoin est fait avec de l'eau non exposée. On laisse en contact pendant dix-sept heures et on fait agir sur 50 cent. cubes d'amygdaline à 2 p. 100. Après deux heures d'action à température ordinaire, on titre le glucose formé.

Témoin, eau non exposée.	0 gr. 195
Eau exposée 6 heures.	0 gr. 202

Avec la présure, je n'ai pas trouvé non plus d'action de l'eau exposée préalablement; avec la laccase et la tyrosinase, j'ai pu

(1) *Loc. cit.*

observer une action très faible en employant de l'eau exposée vingt heures (1).

Un fait qui tend encore à me faire croire à une action de l'eau oxygénée dans la destruction des diastases par les rayons ultra-violets est la production d'un précipité blanc, probablement dû à la caséine végétale des amandes, qu'on observe dans les tubes de quartz, exposés vides ou non, contenant de l'émulsine; ce précipité, dont j'avais déjà noté la formation dans le premier paragraphe de cette note, est soluble dans les alcalis; or, si l'on fait agir sur la même solution d'émulsine une solution d'eau oxygénée, on obtient aussi un précipité soluble dans les alcalis.

Nous avons vu que l'émulsine est attaquée légèrement dans le vide par la lumière visible; ceci nous amène à penser que le mécanisme d'oxydation par l'eau oxygénée, que je viens de décrire, et qui explique parfaitement les faits pour la sucrase, la laccase et la tyrosinase, n'est peut-être pas absolument général et ne suffit pas à tout expliquer. Il y aurait deux façons d'être des diastases vis-à-vis des rayons visibles dans le vide. Nous allons trouver dans la catalase un exemple bien plus accentué que celui de l'émulsine, d'une attaque dans le vide par la lumière visible.

D'après Zeller et Jodlbauer (2), les rayons visibles du spectre ne détruisent la catalase qu'en présence de l'oxygène; la destruction par les radiations ultra-violettes n'est, d'autre part, pas influencée par sa présence ou son absence. Battelli et Stern (3) sont arrivés au contraire au résultat suivant : la destruction de la catalase se produit sous l'influence de la lumière visible avec la même intensité, que l'on se trouve ou non en présence d'oxygène.

J'ai fait sur la catalase de panne de porc et sur celle de foie de veau un certain nombre d'expériences, tant au soleil qu'à la lumière de la lampe à mercure, et les résultats auxquels je suis arrivé ne sont d'accord ni avec ceux de Zeller et Jodlbauer, ni avec ceux de Battelli et Stern. Le tableau suivant donne un certain nombre des chiffres expérimentaux :

(1) Duclaux avait observé une action très nette de l'eau exposée antérieurement aux rayons solaires sur la sucrase. *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 222.

(2) *Biochem. Zeitschr.*, t. VIII, p. 84, 1908.

(3) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXVIII, p. 1040, 1910.

Poids en milligrammes de l'O^2 dégagé par 1 cent. cube de solution diastasique agissant sur 10 cent. cubes d'H^2O^2 a 2 p. 100 (1).

	CATALASE DE PANNE DE PORC			CATALASE DE FOIE		
	A 15 centimètres de la lampe.		Au soleil temps couvert.	Plein soleil.		
Exposition. .	3 h. 3/4.	3 heures.	6 heures.	2 heures.		1 h. 3/4.
Témoin . .	33,28	19,6	40,88	27,52	34,36	38,16
Verre . . .	13,76	6,2	19,76	20,00	30,64	30,3
Verre vide.	»	10,8	28,64	25,68	33,00	33,76
Quartz.	6,4	2,0	17,76	»	»	»
Quartz vide.	17,92	4,3	21,44	»	»	»

Il ressort de cet ensemble de chiffres que la catalase, bien que détruite dans le vide par les rayons visibles, l'est cependant moins qu'en présence d'oxygène, ce qui est en contradiction avec les résultats de Batelli et Stern; d'autre part, la destruction par les rayons ultra-violets est notablement diminuée en l'absence d'oxygène, contrairement à ce que Zeller et Jodlbauer avaient annoncé. Des résultats si différents obtenus au cours de trois travaux successifs sur la même diastase montrent combien les affirmations sont périlleuses sur de telles questions; comme le faisait remarquer Duclaux, la masse même de la diastase est si petite qu'il peut suffire d'une trace d'oxygène pour en provoquer l'oxydation par la lumière; d'autre part, on s'imagine combien peut être grande l'influence des impuretés inconnues qui accompagnent la diastase.

Un troisième mode d'action de la lumière sur les diastases se présente à nous dans l'étude de la présure; celle-ci est inattaquée par les rayons visibles, tandis que la lumière ultra-violette la détruit aussi activement en présence qu'en absence d'oxygène. J'ai expérimenté avec la présure de Hansen en pastilles, et, pour me rendre compte dans une certaine mesure de l'influence possible des sels présents, j'ai employé aussi un

(1) Solution de perhydrol Merck. Les dosages étaient faits en dosant H^2O^2 non décomposé au bout d'un quart d'heure par le permanganate de potassium; par le calcul on a déduit le poids d'O^2 dégagé, le titre de l'H^2O^2 primitive étant connu.

extrait glycériné de ces mêmes pastilles : les résultats ont été les mêmes.

On voit, en résumé, que dans l'état actuel des choses, il n'est pas possible de poser une règle absolue et de donner une unique explication du mécanisme de l'action de la lumière sur les diastases. Trois groupes de diastases se présentent à nous :

L'un renferme la sucrase, la laccase et la tyrosinase, attaquées seulement en présence d'oxygène moléculaire par les rayons visibles, et moins rapidement détruites en l'absence de cet élément par l'ultra-violet. Le mécanisme d'attaque est parfaitement bien expliqué par la formation d'eau oxygénée.

Le second comprend la catalase et l'émulsine, détruites dans le vide par toutes les radiations, moins activement toutefois qu'en présence d'oxygène.

Le troisième est représenté par la présure, insensible aux rayons visibles, mais attaquée par les rayons ultra-violets d'une façon aussi intense en présence d'oxygène ou dans le vide.

L'existence de ces différents types diastasiques est-il dû à la présence dans les solutions de corps étrangers à la diastase ou à la nature même du substratum de celle-ci? On ne saurait répondre actuellement à cette question.

GERMINATION *IN VIVO* DES SPORES D'*A. NIGER* ET D'*A. FUMIGATUS*

par B. SAUTON

L'*Aspergillus fumigatus* est susceptible de se développer spontanément dans l'organisme animal, où il détermine une affection (*Aspergillose*) observée surtout chez les oiseaux et assez répandue chez l'homme pour être considérée, parmi les gaveurs de pigeons et les peigneurs de cheveux, comme une maladie professionnelle.

L'inoculation intraveineuse de spores d'*A. fumigatus* à un pigeon détermine la mort en trois à quatre jours. Tout au contraire, l'injection d'une grande quantité de spores d'*A. niger* est supportée sans inconvénient par les animaux.

Certains auteurs attribuent cette différence d'action des deux microorganismes voisins à une différence entre leur température optima, entre la grosseur des spores, etc.

D'après l'hypothèse plus vraisemblable de Pinoy, les spores de l'espèce pathogène germeraient *in vivo* à la faveur d'une substance toxique qui les protégerait contre l'action destructrice de l'organisme. La mort de l'animal surviendrait ensuite, attribuable selon Kotliar (1), Renon (2), etc., uniquement au développement du mycélium dans les organes, et selon Ceni et Besta (3), Bodin et Gautier (4), etc., à l'action d'une toxine, qui aurait été mise en évidence dans les liquides de culture de l'*A. fumigatus* et dont l'existence est d'ailleurs mise en doute par divers auteurs. D'après Macé (5), les spores agiraient comme un corps solide déterminant un traumatisme local et aussi par un poison — non isolé par l'auteur — qu'elles contiennent.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, p. 479.
(2) *Recherches cliniques et expérimentales sur la pseudo-tuberculose aspergillaire*, 1893.
(3) *Centralbl. f. Pathologie u. pathol. Anatomie*, XIII (1902).
(4) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 209.
(5) *Archives de parasitologie*, VII, 1903, p. 313.

Pour étudier la valeur de ces diverses interprétations, j'ai effectué l'expérience suivante :

Le mycélium bien sporulé d'une culture d'*A. fumigatus* est agité pendant une heure avec du chloroforme, à la température du laboratoire. Les essais de culture et d'inoculation montrent que les spores ainsi traitées sont tuées. On filtre ; on distille le liquide. Les derniers centimètres cubes du résidu de cette distillation sont versés dans une capsule contenant des spores d'*A. niger*, et évaporés en quelques secondes sur le bain-marie. Grâce à la rapidité de cette opération, le chloroforme n'exerce aucune action nocive sur les spores d'*A. niger*, mais il les imprègne des substances extraites de l'*A. fumigatus*. Les spores d'*A. niger* enrobées par l'extrait chloroformique d'*A. fumigatus* sont émulsionnées dans du bouillon et aussitôt injectées dans les veines de deux pigeons. On injecte en même temps à d'autres pigeons, qui servent de témoins, soit de l'extrait chloroformique seul, soit des spores d'*A. niger* normales ou enrobées d'un extrait chloroformique d'*A. niger* qui les rend plus épaisses, plus résistantes, ou traitées par le chloroforme seul.

Après plusieurs semaines, aucun des pigeons témoins ne présente les symptômes d'une affection quelconque.

Il est intéressant de constater que, tout au contraire, les animaux inoculés avec les spores d'*A. niger* enrobées de l'extrait d'*A. fumigatus* meurent en général du troisième au sixième jour. Parfois pourtant un pigeon, quarante-huit heures après l'inoculation, présente un aspect abattu, se met en boule, puis se rétablit en quelques jours. Dans mes essais, j'ai obtenu en moyenne la mort de trois animaux sur quatre mis en expérience. On observe à l'autopsie, pratiquée immédiatement après la mort, les lésions caractéristiques de l'*Aspergillose* expérimentale. Mais contrairement à ce qui se passe dans le cas de l'inoculation intraveineuse de *A. fumigatus* au pigeon, le mycélium est plus localisé au poumon qu'au foie.

Sur des coupes, il est facile d'observer le développement du mycélium dans les tissus, et des fragments de ces organes envahis, ensemencés sur gélose, fournissent une culture caractéristique d'*A. niger*.

On peut conclure de cette expérience que, comme la spore

tétanique dans l'expérience de Vaillard, celle d'*A. fumigatus* renferme une substance qui la protège contre la phagocytose. Cette substance, dont je me propose d'étudier la nature, permet même la germination, dans l'organisme animal, de spores non pathogènes qui en ont été imprégnées, et il est probable que l'expérience effectuée avec l'*A. niger* pourraît être reproduite avec d'autres moisissures s'accommodant d'une température de 40 degrés.

Le fait que, par cet artifice, l'*A. niger*, non producteur de toxine, se développe dans les organes et provoque la mort, fait présumer que, dans l'*Aspergillose*, la mort serait due uniquement au développement du mycélium et non à l'action d'une toxine.

Dans l'espoir d'augmenter la résistance des pigeons à l'*Aspergillose*, en les accoutumant à la substance toxique contenue dans les spores d'*A. fumigatus*, j'ai injecté sous la peau à trois de ces animaux des doses massives de ces spores à six reprises et à six jours d'intervalle. Cette injection sous-cutanée ne provoque aucune affection (1). Mais je n'ai pas constaté, par ce procédé, une plus grande résistance des pigeons à une inoculation intraveineuse ultérieure, et la mort est survenue du troisième au quatrième jour.

(1) De même, j'ai constaté que l'inoculation d'*A. fumigatus* dans la bourse plantaire n'était suivie d'aucun effet. Ce procédé, dû à Pinoy, lui a donné au contraire des résultats positifs dans le cas de l'*Aspergillus nidulans*.

LA DESTRUCTION INTRASPLÉNIQUE ET INTRAHÉPATIQUE DE CORPUSCULES ROUGES DU SANG

DANS LES CONDITIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES

(avec les Pl. I et II)

par le Dr I.-I. LINTVAREV
Prosecteur à l'hôpital Alexandre, à Saratov.

Depuis le mémoire de Quincke (1), il est établi que, chez l'homme adulte et sain, c'est surtout dans le foie que se fait la destruction de corpuscules rouges du sang. Les érythrocytes, en se désagrégeant ici, fournissent aux cellules hépatiques le matériel nécessaire à l'élaboration de la bile, à la transformation du pigment sanguin en pigments biliaires.

Il est établi également qu'une destruction d'érythrocytes se produit aussi dans la rate et dans la moelle osseuse, car on y trouve des cellules contenant ces éléments figurés. Quincke estime que les globules rouges du sang sont absorbés par les leucocytes dans les vaisseaux capillaires du foie.

Mais, dans la littérature scientifique, on ne trouve aucune indication sur la façon dont les cellules hépatiques incorporent les produits de destruction des érythrocytes. La durée du passage des éléments figurés du sang, de la périphérie du lobule hépatique à son centre, doit se mesurer en fractions de seconde, quelque ralentie que puisse être la circulation dans le foie. Au point de vue de l'irrigation sanguine, ne doit-on pas considérer chaque lobule hépatique comme un élément indépendant auquel le sang est amené par un vaisseau (veinule-porte ou interlobulaire), l'écoulement en retour se faisant également par un tube fermé? Donc, en n'interprétant les choses que par leur côté physico-chimique, on ne saurait comprendre comment, en ce court laps de temps, l'érythrocyte parvient à se détruire et à livrer aux cellules hépatiques les produits de sa destruction. Mais comme, d'autre part, le fait même de l'absorption de l'hémoglobine par les cellules du foie

n'est point douteux (on peut toujours déceler l'hémosidérine dans cet organe), force est d'admettre *a priori* l'existence de certaines conditions propres à retenir les éléments figurés du sang dans les capillaires du foie, rétention qui rendrait possible, d'un côté, l'action destructive des cellules hépatiques sur ces éléments et, d'un autre côté, la résorption des produits de cette destruction.

L'étude d'un cas d'anémie liée à la maladie de Banti (anémie mégalo-splénique avec cirrhose du foie) nous a fourni l'occasion de constater certaines adaptations, fort simples, de l'organisme, à l'aide desquelles s'effectuent la destruction et la résorption des éléments figurés du sang dans la rate et dans le foie.

Ces recherches ayant donné des résultats importants, je me permettrai de relater ici le compte rendu de l'autopsie du sujet mort de la maladie de Banti, autopsie faite le 19 novembre 1910.

Examen général externe. — Homme de forte constitution, très amaigri. Téguments pâles, grisâtres. Muqueuses pâles. Conjonctives oculaires légèrement ictériques. Pupilles non dilatées. Cage thoracique élargie par en bas. Abdomen non ballonné, légèrement excavé. Léger œdème sous-cutané au niveau des malléoles externes. Aux parties déclives, légère coloration rougeâtre (hypostase). Rigidité cadavérique peu apparente.

Examen externe des cavités thoracique et abdominale. — Grand épiploon sans adhérences, pauvre en graisse. Intestins non distendus. Bord inférieur de la rate à un travers de doigt au-dessous de l'ombilic. Bord du foie au niveau du rebord des fausses côtes (sur la ligne mamelonnaire). La cavité abdominale renferme 1 litre de sérosité limpide. Diaphragme au niveau inférieur de la cinquième côte, des deux côtés.

Cartilages costaux ossifiés. Triangle cardiaque peu ouvert. La cavité pleurale gauche contient la valeur d'un verre de sérosité. Poumon gauche libre d'adhérences. Poumon droit adhérent par son bord postéro-latéral; son lobe inférieur est libre. Dans la cavité pleurale droite, quelques dizaines de grammes d'un épanchement séreux. Le péricarde contient 100 grammes environ de sérosité.

Cavité thoracique. — Poumons anémiés et œdémateux. Dans

leurs parties postéro-inférieures, on constate des foyers de pneumonie hypostatique.

Cœur assez petit, ventricule gauche non contracté, tissu cellulaire de l'épicarde muco-purulent. Artères coronaires sinueuses avec épaississements scléreux qu'on aperçoit même à travers la paroi vasculaire. Myocarde brunâtre, trouble, mais nullement flasque. Bords de la tricuspide un peu épaissis. Dans les cavités droites du cœur, quelques caillots fibrineux et du sang liquide. Valvules du cœur gauche sans altérations, quelques caillots sanguins dans les cavités. Dans la crosse de l'aorte, légères altérations scléreuses de la tunique interne.

Cavité abdominale. — Rate grosse (longueur, 24 cent. 5; largeur, 12 centimètres; épaisseur, 5 cent. 5; poids, 845 gr.); la capsule est mince, peu tendue, l'organe est élastique, modérément dur. Sur les coupes, la surface est lisse, brillante; par le raclage, on n'obtient que peu de pulpe. Tissu de la rate de couleur rouge vif, partout uniforme. Les trabécules sont bien apparents, les corpuscules de Malpighi ne le sont que peu. Artère splénique manifestement sclérosée. Sur la tunique interne de la veine splénique, petits placards de sclérose. Rein gauche un peu gros, sa capsule se laisse enlever en totalité. Substance corticale légèrement élargie, de coloration rouge-grisâtre. Les pyramides sont plus foncées que la substance corticale. Le rein droit présente le même état avec cette seule différence que sa capsule adhère par places à l'écorce. Bassinets, uretères et vessie sans altérations morbides.

Foie légèrement augmenté de volume, mais dans son lobe droit seulement. Le lobe gauche est petit et présente, le long du bord gauche du ligament suspenseur, un sillon d'atrophie, assez profond, sans trace de cicatrices. La surface du foie est finement granulée sur les bords, lisse sur les parties convexes. Le tissu hépatique craque quand on le coupe; la surface de section sur les bords de l'organe est granulée, par suite de prolifération annulaire du tissu conjonctif. Veinules centrales gorgées de sang. Les lobules sont bien apparents du fait d'une coloration rouge-brunâtre de leurs centres, les bords étant bien plus clairs. La vésicule biliaire contient 30 grammes environ de bile liquide, jaune-verdâtre; sa muqueuse ne présente pas

d'altérations; les conduits biliaires sont libres, sans mucosités. Le foie pèse 1.630 grammes.

Muqueuse gastrique un peu tuméfiée, granuleuse, rouge-grisâtre. Muqueuse duodénale congestionnée; orifice du conduit biliaire libre. A la partie inférieure de l'intestin grêle, la muqueuse congestionnée est le siège d'une multitude de petites ulcérations catarrhales superficielles. Muqueuse du gros intestin légèrement épaissie, congestionnée, recouverte de mucosités; pas d'ulcérations. Certains ganglions mésentériques du volume d'une noisette, mais non indurés; sur les coupes, leur tissu est congestionné, de couleur rose grisâtre. La moelle osseuse des deux fémurs est rouge.

Épicrise. — Anémie. Ictère léger. Emphysème pulmonaire. Pneumonie hypostatique double. Atrophie jaune du myocarde. Sclérose de la crosse de l'aorte et des artères coronaires du cœur. Splénomégalie. Cirrhose interstitielle portale et cyanose du foie. Néphrite interstitielle chronique légère. Entéro-colite catarrhale. Ascite.

Diagnostic anatomique. — Anémie mégalosplénique avec cirrhose du foie : maladie de Banti.

Age, quarante-sept ans. Le début de l'affection remonte à six ans, époque à laquelle les médecins et le malade lui-même remarquèrent une augmentation du volume de la rate. L'examen hématologique, fait deux mois environ avant la mort, décela une anémie manifeste : dans 1 centimètre cube de sang, on comptait 1.665.000 érythrocytes, 8.158 leucocytes, hémoglobine 55 p. 100. La température, en général irrégulière, atteignait parfois 38°5 et 38°9. L'ascite ne fut remarqué que dix jours avant la mort. L'ictère existait depuis longtemps. Antécédents du malade négatifs en ce qui concerne la syphilis ou une infection malarienne.

Erythrocytes altérés : beaucoup de cyanophiles (polychromatophiles), des macrocytes et des microcytes, ainsi que des éléments de forme anormale : poikilocytes. Ces derniers rares. Point d'érythroblastes.

Pour l'examen microscopique, on fixait dans l'acétone des parcelles de rate et de foie. Ce procédé est très commode : il est rapide, permet de monter les préparations en un bloc solide, conserve parfaitement les éléments figurés du sang et

empêche l'issue de l'hémoglobine des érythrocytes, laquelle se produit toujours avec le montage à la formaline (ou mélanges formalinés). Malheureusement, presque toutes les préparations anatomo-pathologiques et histologiques de nos musées se font au moyen de la formaline, ce qui les rend impropres à l'étude des globules rouges du sang.

Pour bien mettre en évidence combien la fixation par la formaline convient peu à l'étude des érythrocytes dans les tissus, j'ai fait la petite expérience que voici : une coupe fixée dans l'acétone et où l'on voyait bien la disposition des corpuscules rouges colorés par l'azur-éosine, d'après le procédé de Giemsa, fut immergée, pendant deux semaines, dans une solution de formaline à 4 p. 100, puis traitée par le même colorant. Pas un seul érythrocyte ne se colora en rose par l'éosine, et les cellules contenant des globules rouges du sang apparaissaient comme dégénérées, avec des vacuoles dont les dimensions correspondaient à celles des érythrocytes. Bref, on avait une vacuolisation dite en rayons de miel (wabige Vacuolisation des auteurs allemands). En plus, le protoplasma délicat de nombre de cellules vacuolisées ne se distinguait que très imparfaitement à l'examen microscopique, si bien qu'on pouvait prendre facilement la cellule pour du détritus.

J'insiste sur ces défauts de la fixation par la formaline. Si les remarquables tableaux qu'on voit sur nos préparations n'ont pas encore été observés par d'autres, on doit en attribuer la cause uniquement au montage défectueux dans la formaline dont l'usage est répandu depuis près de vingt ans en technique histologique.

Après ces quelques remarques préliminaires, je passe à la description de ce que j'ai observé au microscope sur les coupes de rate et de foie dans la maladie de Banti. Ces constatations contribuèrent singulièrement à élargir le champ de mes observations ultérieures.

A l'examen de préparations microscopiques de la rate, je fus tout d'abord frappé par la teneur abondante de cet organe en grosses cellules gorgées de globules sanguins. Situées, d'habitude, à l'intérieur des sinus dilatés de la rate (Pl. I, fig. 1), elles ont un protoplasma finement granulé et mou, un noyau vésiculeux assez volumineux avec un très fin réticule de chro-

matine. Ces cellules ne sont pas toutes de mêmes dimensions (entre 14 et 60 μ), différence due au nombre de globules rouges qu'elles renferment : plus il y a d'érythrocytes, plus grosse est la cellule ; les plus petites sont celles qui ne contiennent pas encore de globules rouges, mais elles sont peu nombreuses. Le protoplasma de ces éléments cellulaires se colore bien par l'éosine, prenant une teinte rose-violette plus ou moins intense. Ces cellules sont généralement mononucléaires, mais elles peuvent aussi contenir deux, trois noyaux ou même davantage. Parfois elles sont si nombreuses qu'elles remplissent complètement la veine dilatée. Par leur ressemblance avec les cellules épithéliales, elles donnent un tableau rappelant beaucoup les alvéoles carcinomateuses, comme le fit observer Banti lui-même (2). On voit parfois lesdites cellules parmi les éléments de la pulpe splénique, mais ici les noyaux cellulaires ne se laissent pas colorer, pour la plupart, et ils disparaissent. On rencontre aussi ces éléments anucléés, en voie de destruction, dans les sinus sanguins et dans les veines. Cependant, la plupart des cellules situées à l'intérieur des vaisseaux ne présentent pas de phénomènes de désagrégation. Il est intéressant de noter que ces cellules s'accumulent de préférence à proximité et au pourtour des corpuscules de Malpighi de la rate.

Ces éléments si particuliers renferment, comme nous l'avons dit, des érythrocytes en nombre variable : certains jusqu'à 50, d'autres 1 ou 2 seulement. La cellule qui contient beaucoup d'érythrocytes affecte une forme vésiculeuse, et son protoplasma se dispose autour du contenu en une sorte d'enveloppe très mince dont un point renflé renferme un noyau aplati, généralement en forme de croissant. Une telle cellule rappelle beaucoup une cellule adipeuse, avec cette différence, toutefois, qu'au lieu d'une grosse goutte de graisse, elle englobe un amas d'érythrocytes. Sur une coupe transversale, elle apparaît comme un anneau dont le châton correspondrait au noyau et dont la partie circulaire contiendrait les globules sanguins.

Les érythrocytes happés par ces « *érythrophages* » (*) de la

(*) Nous sommes les premiers à proposer la dénomination d'érythrophages pour ce genre de cellules dévoreuses de globules sanguins.

rate ne perdent pas, d'habitude, leurs caractères morphologiques : ils se colorent par l'éosine tout aussi bien que les globules rouges voisins encore libres, présentent à leur milieu une concavité caractéristique à rebord circonvallaire, et ne sont pas granuleux. Ils ne se distinguent donc en rien des érythrocytes normaux, si ce n'est par un aplatissement latéral dans les cas où ils sont nombreux, ce qui précisément donne à leurs groupes, englobés par les cellules dont il s'agit, l'aspect de rayons de miel.

Dans d'autres érythrophages, on trouve, au contraire, des globules rouges ayant perdu plus ou moins la faculté de se colorer par l'éosine ; certains se désagrègent déjà et ne laissent subsister après eux, à l'intérieur d'érythrophages également en voie de destruction, que des granules d'un pigment foncé. Ce processus de destruction, dans la rate, de cellules contenant des globules sanguins, était, comme nous l'avons dit, peu accusé chez notre malade. Les éléments en voie de désintégration se trouvaient surtout dans la pulpe splénique, mais il n'y avait que relativement peu d'érythrophages.

Or, il est facile de se rendre compte des proportions immenses que doit avoir le processus d'absorption des érythrocytes par ces cellules de la rate, d'après le calcul suivant. Dans le champ du microscope, avec un grossissement de 400 à 500, on peut, en moyenne, compter de 8 à 10 érythrophages (fig. 2). Combien de millions de champs pareils ne pourrait-on pas obtenir en réduisant en coupes microscopiques la masse totale de cette rate pesant 845 grammes ! Et si une perte aussi énorme en globules sanguins ne se couvrait pas par l'activité fonctionnelle des organes hématopoiétiques (moelle osseuse), des 26 à 30 milliards d'érythrocytes d'un adulte, il n'en subsisterait plus un seul au bout de quelques jours.

Le foyer principal de cette destruction complète et massive d'érythrophages et de leur contenu est, sans doute, le foie, puisque la veine splénique s'ouvre dans la veine porte et que son sang mélangé au sang d'autres racines de la veine porte vient irriguer les lobules hépatiques.

Donc, si l'on trouve tant d'érythrophages dans les sinus et les veines de la rate, on doit en trouver aussi dans les capillaires du foie.

Et de fait, l'examen histologique de coupes de foie, colorées également par le Giemsa, nous le montre d'une façon évidente (fig. 3).

Les parties périphériques des capillaires, légèrement dilatés, sont bourrées d'érythrophages dont le nombre est si grand ici que, parfois, il devient difficile de les compter dans le champ du microscope.

Dans le foie, les érythrophages présentent les mêmes particularités que dans la rate, et on les y reconnaît à première vue : ce sont aussi de grosses cellules gorgées de globules sanguins. Ils ne diffèrent des érythrophages de la rate que par la présence de formes de désagrégation. Ainsi, dans certains d'entre eux, on ne distingue plus de noyau ; dans d'autres, les globules rouges ne se colorent plus, et, à leur place, on remarque, dans le protoplasma, des granules foncés de pigment, reliquats d'érythrocytes. D'autres encore se présentent comme des grumeaux troués et flasques, d'un protoplasma difficilement colorable. Enfin, il en est qui affectent la forme de cellules plus ou moins remplies de globules rouges en voie de destruction et qui contiennent, en plus, des gouttelettes de bile, jaune-verdâtre, de dimensions variables, ne différant de celles qu'on trouve dans les cellules des travées hépatiques que par leurs dimensions : les gouttelettes de bile à l'intérieur des cellules hépatiques sont, le plus souvent, petites, comme des grains de poussière.

La plupart des érythrophages sont situés dans les capillaires des parties périphériques du lobule hépatique ; ils adhèrent aux parois des capillaires et forment un bloc avec les cellules du foie, dont ils ne sont séparés que par une mince membrane endothéliale. La cause qui oblige les érythrophages à adhérer aux parois des capillaires hépatiques, dès leur entrée dans ceux-ci, réside dans les propriétés mêmes du protoplasma de ces cellules, propriétés qu'on peut bien étudier, en solution isotonique, sur des érythrophages n'ayant subi aucun traitement préalable. A cet effet, on n'a qu'à racler légèrement avec une lame la surface d'une coupe fraîche de foie contenant des érythrophages et à examiner le suc ainsi obtenu dans du sérum physiologique. Il est alors facile de déceler ces dévoreurs de globules rouges (fig. 4)

Le suc de la rate renferme également, dans certains cas, nombre d'érythrophages, mais ils n'y sont pas aussi apparents, car le raclage de la surface d'une coupe de tissu splénique détache, avec les érythrophages, beaucoup d'autres éléments figurés de la pulpe et du sang, ce qui rend difficiles la recherche et l'étude des cellules en question.

En sérum physiologique, les érythrophages se présentent comme des éléments assez gros (jusqu'à 60 μ de diamètre) avec protoplasma très finement granulé, délicat, dont la quantité dépend du nombre des globules rouges inclus : plus la cellule en contient, plus elle est volumineuse et plus mince est aussi la frange protoplasmique qui entoure, à l'instar d'un anneau, le groupe d'érythrocytes englobés. Le noyau est toujours unique : il est situé quelque part de côté, dans un renflement du protoplasma. Vésiculeux et assez gros, il n'est pas bien visible dans toutes les cellules. Le nombre de globules rouges inclus n'est-il pas considérable, la cellule elle-même est petite et contient alors relativement plus de protoplasma. La forme des érythrophages est des plus variées : sphérique, si la cellule renferme beaucoup de globules rouges (on le voit particulièrement bien à l'examen d'une goutte pendante), petite, de forme irrégulière et à bords souvent inégaux, lorsque l'érythrophage ne contient que peu ou point de globules rouges. Ces cellules ont une grande ressemblance avec les éléments de l'endothélium ou de l'épithélium.

Les érythrophages sont très instables; ils se détruisent avec une facilité extraordinaire dans les solutions indifférentes. Au bout de quelques heures, il est déjà difficile de les y déceler : ils sont transformés en un détritus méconnaissable, et c'est pour cela que le raclage ne permet pas d'obtenir de préparations bonnes et durables. Les érythrophages ne supportent même pas le procédé de fixation le plus delicat. Sur des préparations desséchées et colorées, on voit une masse amorphe étendue sur la lame de verre avec quelques globules rouges plus ou moins altérés, et, par places, un noyau appartenant tantôt à un érythrocyte, tantôt à un leucocyte happé par un globule rouge.

L'instabilité du protoplasma de ces cellules a sa portée physiologique : grâce à elle, la destruction et l'élimination des

érythrophages s'effectuent assez rapidement pour que de nouvelles quantités de ces porteurs de globules rouges puissent pénétrer dans les capillaires du foie. S'ils ne se détruisaient aussi rapidement dans cet organe, une stase sanguine pourrait facilement se produire, due à l'occlusion des capillaires hépatiques par les masses accumulées. Or, jamais on n'observe chose pareille, alors même que le processus de destruction des globules rouges est des plus intenses.

Le protoplasma des cellules dont il s'agit est très visqueux. On peut en juger par l'examen d'une préparation fraîche en solution isotonique, le tube du microscope étant tenu horizontalement et la préparation elle-même se trouvant dans une position verticale. Dans ces conditions, les érythrophages se trouvent immobilisés, tandis que les autres éléments figurés (globules rouges, cellules hépatiques, leucocytes), entraînés en bas par la force de la pesanteur, disparaissent du champ du microscope. Avec ce dispositif, nous avons obtenu le microphotogramme que nous donnons ici (fig. 4) et sur lequel on voit deux érythrophages (contenant chacun plusieurs globules rouges) et quelques cellules hépatiques à côté d'eux.

Ainsi donc, les érythrophages possèdent, d'habitude, un protoplasma volumineux, mou, visqueux et instable. Le globule rouge y pénètre très facilement, même s'il a conservé toute son élasticité (Quincke estime qu'un érythrocyte en vieillissant, en mourant, perd son élasticité). C'est même à cause de sa parfaite élasticité, sous l'influence du courant sanguin et du bombardement incessant par les autres éléments figurés, qu'il est, pour ainsi dire, enfoncé dans le protoplasma flasque d'un érythrophage adhérant, quelque part, à une paroi vasculaire, sans que, pour le happer, cet érythrophage fût obligé de faire des mouvements amiboïdes qui, s'ils se produisent, facilitent, sans doute, l'englobement de l'érythrocyte.

Les érythrophages dévorent donc les globules rouges non pas mourants, mais actifs, c'est-à-dire des éléments figurés du sang, qui viennent en contact avec eux. Il serait, en effet, difficile d'admettre que l'érythrophage fût doué de cette extraordinaire propriété de ne happer, parmi les milliards de globules rouges, que ceux qui se meurent. On trouve, il est vrai, à l'intérieur de phagocytes, des globules rouges intacts, d'autres

en voie de destruction ou leurs reliquats, du pigment sanguin et des corpuscules étrangers, mais cela n'est point en contradiction avec ce qui vient d'être dit, car les érythrocytes ne se désagrègent en fragments et en pigment qu'à l'intérieur des cellules qui les englobent et par une sorte de digestion intracellulaire. Quant aux corpuscules étrangers, ils pénètrent dans les érythrocytes de la même façon que les éléments figurés.

En conséquence, j'estime que le processus de régénération des globules rouges dans les anémies, comme aussi dans les conditions normales, s'effectue essentiellement de la façon suivante : une partie des éléments cellulaires du sang est constamment absorbée par les érythrophages spléniques dont certains se détruisent dans la rate elle-même, mais dont la plupart sont charriés par le sang au foie, où se créent les conditions les plus favorables à leur destruction et à la résorption des produits de ce processus. Les éléments détruits du sang sont remplacés par de nouveaux, élaborés dans la moelle osseuse. Ainsi, toute la masse sanguine est renouvelée en un certain temps. Il n'existe ici, entre l'état normal et l'état pathologique (anémies), qu'une différence de quantité, et si la moelle osseuse parvient facilement à remplacer une déperdition normale, sa fonction régénératrice devient, par contre, insuffisante lors d'une destruction excessive d'érythrocytes : on a alors une anémie quantitative. Or, comme, avec une hématopoïèse forcée, le sang reçoit de la moelle osseuse des éléments hâtivement formés, donc imparfaits (formes jeunes), on voit survenir aussi des altérations qualitatives dans sa composition.

D'autre part, l'érythrophage visqueux et volumineux pénètre dans un capillaire du foie où la circulation sanguine se ralentit ; il adhère aussitôt à la paroi du capillaire, vers la périphérie du lobule hépatique, et s'y arrête. De cette façon se trouvent réalisées les conditions indispensables à la destruction et à la résorption de ces éléments et de leur contenu.

On obtient un excellent tableau de ces phénomènes de destruction d'érythrophages, si, avant de colorer la coupe microscopique, on fait l'épreuve de la réaction microchimique du fer (imprégner la préparation de ferrocyanure de potassium, puis la traiter par l'acide chlorhydrique). On peut alors étudier

en détail les diverses phases de destruction des globules rouges incorporés par les érythrophages.

Sur des coupes de rate, on voit la plupart des érythrophages renfermer des globules rouges non altérés, dont le fer se trouve encore à l'état de combinaison organique parfaite : ni ces globules ni le corps de la cellule qui les contient ne se colorent par le bleu de Prusse. Parfois seulement, on peut rencontrer une cellule dont le corps est légèrement bleuté, mais les globules rouges qu'elle renferme ne donnent pas encore la réaction du fer. En d'autres parties, on aperçoit des cellules avec érythrocytes en voie de destruction, puisqu'ils sont colorés en bleu, et, dans leur corps, on voit déjà des amas libres d'hémosidérine. Les cellules de ce genre sont situées à l'intérieur des sinus et des veines de la rate. On décèle aussi du fer dans la pulpe splénique, mais très peu et aux points seulement où se trouvent des érythrophages en voie de désagrégation, et dans lesquels on ne discerne plus ni le noyau ni les érythrocytes englobés. Dans le stroma de la rate, ainsi qu'au pourtour des vaisseaux, notamment dans les espaces lymphatiques périvasculaires des artères des corpuscules de Malpighi, on peut trouver quelques grains disséminés de bleu de Prusse, parfois même en petits amas. Mais en général, il n'y a que peu d'hémosidérine dans la rate. Il en est autrement du foie : une coupe de cet organe, immergée, pendant quelque temps, dans une solution de ferrocyanure de potassium, puis plongée dans une solution d'acide chlorhydrique, commence à bleuir et prend rapidement une couleur bleue intense, comme si on l'avait colorée par la solution de bleu de méthylène de Lœffler. Le foie est donc ferrugineux. A l'examen microscopique des préparations du foie colorées après ladite réaction, on trouve de grands dépôts de fer dans les érythrophages, de même que dans les cellules hépatiques, en partie aussi dans les endothéliums des capillaires et le long des vaisseaux du tissu conjonctif interlobulaire. Autour des cellules hépatiques, les dépôts de fer affectent la forme de petits granules soit disséminés dans le corps cellulaire, soit amoncelés à une extrémité de la cellule ou près de son noyau seulement. Certaines cellules contiennent plus de fer, d'autres en contiennent moins, mais toujours il est réparti de façon plus ou moins uniforme. Or, il

en est autrement des érythrophages. Dans les capillaires, on est frappé de la grosseur des amas bleus qui correspondent aux cellules chargées de globules rouges. Plus ces amas sont apparents, moins ils contiennent de fer et mieux est coloré le noyau de l'érythrophage. D'autre part, on trouve des exemplaires où l'on ne peut distinguer ni noyau ni érythrocytes, la cellule figurant alors un amas de grosses particules de fer incluses dans une fine enveloppe bleutée ; parfois, on n'aperçoit pas d'enveloppe. Entre ces deux extrêmes, il existe nombre de transitions, d'après lesquelles on peut se faire une idée nette de la marche progressive du processus de destruction des globules rouges et des cellules qui les renferment, ainsi que de leur complète désagrégation et de leur résorption, lorsque, à la place de l'ancienne cellule, il ne subsiste plus qu'un stroma troué, à peine coloré en gris, ou de fins granules de détritus et quelques particules de fer.

Le fer s'accumule surtout à la périphérie des lobules hépatiques, et sa présence en énormes quantités, en ces points, montre que c'est surtout ici que s'effectue la destruction des globules rouges. Ce fait est d'un intérêt capital, puisqu'il montre d'une façon évidente que la destruction massive d'érythrophages, dans les parties périphériques des lobules du foie, libère ici-même quantité de produits de désintégration de globules rouges. Leur accumulation détermine nécessairement de l'irritation des parties périphériques des lobules, irritation d'autant plus considérable que le processus est, lui-même, plus accusé. S'il est chronique, il provoque des phénomènes inflammatoires dans le tissu conjonctif interlobulaire. Autrement dit, *une destruction intense d'érythrocytes qui se produit, par l'intermédiaire des érythrophages, dans les parties périphériques des lobules du foie, détermine une prolifération du tissu conjonctif interlobulaire.* Nous avons donc là une explication fort simple de la pathogénie de la cirrhose du foie.

Revenant maintenant à l'autopsie de notre malade, nous trouvons, en effet, surtout sur les bords du foie et dans son lobe gauche, une cirrhose annulaire très accusée. Banti estime que, dans l'anémie splénique, la cirrhose du foie apparaît non au début de la maladie, mais dans sa troisième ou dernière période, et qu'elle est précédée, de longtemps, d'un état

anémique et de splénomégalie. Cet auteur place dans la rate la cause de la maladie et, en conséquence, il propose d'enlever cet organe. Et de fait, après splénectomie, on voit la guérison survenir dans nombre de cas, tandis que, sans cette opération, la mort est inévitable. Maragliano, dans 11 cas de splénectomie pour maladie de Banti, enregistre 9 guérisons ; Jordan vit guérir 14 de ses 17 opérés, Bessel-Hagen, Harris et Herzog [je cite d'après F. Klopstock (3)], relatent aussi des guérisons après extirpation de la rate.

Klopstock (p. 114), se fondant sur ces données, estime, avec Banti, que « la tuméfaction de la rate dans la maladie en question, loin de figurer un phénomène concomitant, est le trait essentiel du tableau clinique ».

Nos recherches ont montré que dans la rate apparaissent, en énorme quantité, des cellules qui dévorent les globules rouges. Donc, la splénectomie enlève de l'organisme le foyer où se produit la destruction d'érythrocytes. Après extirpation de la rate, on ne trouve plus d'érythrophages dans le foie, donc plus de produits de leur destruction. Aussi voit-on s'amender les phénomènes de cirrhose, ou bien celle-ci, lorsqu'elle ne s'était pas encore développée, ne se montre pas.

Une irritation du tissu conjonctif par destruction excessive de globules rouges, laquelle, dans le foie, amène finalement des lésions cirrhotiques, doit se produire aussi, il va sans dire, dans le stroma de la pulpe splénique, et cela en raison directe du nombre de globules rouges (ou d'érythrophages) détruits dans la rate. Dans notre observation de maladie de Banti, la tuméfaction et l'induration considérables de la rate dépendaient surtout de la prolifération et de l'épaississement de la pulpe splénique. Des cas ont été décrits où la splénomégalie était encore plus accusée ; le poids de la rate atteignait parfois 1.200 grammes et même plus [Zielger (4)]. Les corpuscules de Malpighi sont altérés : autour des artères, on remarque un épaississement de la gaine de tissu conjonctif et, parmi les éléments lymphoïdes de quelques corpuscules de Malpighi, notamment dans les parties centrales, on relève parfois les indices d'une division indirecte des noyaux (phénomènes de prolifération). Dans les parties périphériques, on peut rencontrer des cellules plus volumineuses, ne se distin-

guant en rien des érythrophages, et dont certaines contiennent aussi des globules rouges. On ne constate la présence du fer qu'autour des artères.

Ainsi donc, dans notre observation de maladie de Banti. l'anémie, qui avait été très manifeste cliniquement, dépendait d'une absorption excessive de globules rouges par les érythrophages de la rate. Certains de ces globules étaient détruits sur place, mais la plupart pénétraient dans le foie. C'est ici que s'achevait leur destruction, dont les produits étaient en partie résorbés par les cellules hépatiques, en partie charriés dans le torrent de la circulation générale. L'organe dans lequel s'effectue la destruction d'érythrocytes réagit aux produits de cette destruction, s'ils se trouvent en grande quantité, par une néoformation inflammatoire du tissu conjonctif, laquelle, dans la rate, aboutit à la splénomégalie (fibro-adénie de Banti), et, dans le foie, à la cirrhose. La moelle osseuse, passant de l'état quiescent à l'état actif, devient rouge, lymphoïde et s'efforce de remplacer la déperdition massive de l'organisme en érythrocytes, mais son activité est insuffisante quantitativement (anémie quantitative) et qualitativement. Aussi voit-on apparaître dans le sang des formes incomplètement développées ou jeunes : polychromatophiles, érythrocytes nucléés (formes à teneur insuffisante en hémoglobine), érythrocytes déformés, macrocytes, microcytes, quelques poikilocytes. En effet, beaucoup d'hémoglobine ayant été éliminée de l'organisme avec la bile, il n'en reste pas assez pour la formation de globules rouges normaux, d'où pléiochromie et, comme conséquence, surproduction de bile par le foie ou polycholie, ainsi que l'ont montré les travaux de Naounin, de Stadelmann, de M. I. Afanassiev et d'autres. Une résorption plus active des produits de destruction de globules rouges, produits qui sont fébrigènes, détermine en même temps des hyperthermies constantes, bien qu'irrégulières, et amène, en général, des phénomènes d'intoxication par les ferments dérivés des globules rouges [Silbermann (5)].

Cette destruction exagérée de globules rouges est intimement liée à l' « ictère hématogène ». Nous avons vu que dans beaucoup d'érythrophages du foie, dans la maladie de Banti, on trouve, en plus des globules rouges et de leurs reliquats, des

gouttelettes de bile. Il importe de noter la présence de bile dans ces cellules, puisqu'elle nous fournit l'explication du mécanisme de l'ictère par la destruction massive des globules rouges.

L'élaboration de bile n'est guère possible que par l'activité des cellules hépatiques. Quincke et ses élèves ont montré que, dans l'organisme humain, il n'existe pas d'autre lieu, d'autres cellules pour la production de la bile qui est, de la sorte, fabriquée exclusivement par les cellules hépatiques. Si donc les érythrophages du foie contiennent de la bile (*), ils ne l'élaborent pas eux-mêmes, mais la reçoivent des cellules hépatiques. La pénétration de bile dans le corps de l'érythrophage se fait de la façon suivante : l'érythrophage, en raison de sa viscosité, s'arrête à la paroi d'un capillaire, ne se trouvant séparé de la cellule hépatique que par une très mince membrane endothéliale. Les conditions sont donc favorables à l'osmose : les produits de digestion des globules rouges par le protoplasma des érythrophages pénètrent dans les cellules hépatiques où ils servent à l'élaboration de la bile. Plus il y a de ces produits, plus il se forme de bile. Mais où il y a endosmose, il y a aussi exosmose; la bile formée dans les cellules du foie doit pénétrer, au moins en partie, dans le corps des érythrophages, et il serait bien étrange si ce phénomène ne se produisait pas. Par la suite, toujours sous l'influence du même processus osmotique, les érythrophages sont complètement détruits, les gouttelettes de bile qu'ils contenaient parviennent dans le sang et, s'il y en a beaucoup, on voit apparaître une coloration jaune des téguments, l'ictère.

Expliquer l'ictère lié à une destruction excessive de globules rouges n'est pas établir une nouvelle théorie, c'est simplement interpréter un fait non douteux d'observation.

Dans notre cas de maladie de Banti, il y avait ictère léger, mais incontestable et persistant. Or, comme le montra l'autopsie, il n'y avait pas de rétention de bile, donc il ne s'agissait pas d'un ictère par rétention; les conduits biliaires étaient intacts, l'orifice du cholédoque dans le duodénum était libre.

Nous avons donc pu élucider le syndrome de l'anémie de Banti; reste à déterminer la cause première de la multiplica-

(*) Les érythrophages de la rate n'en renferment jamais.

tion et de la suractivité des érythrophages. Nous en parlerons plus loin.

Le fait même de la destruction de certaines cellules de l'organisme par d'autres éléments cellulaires est si apparent dans notre observation de maladie de Banti qu'il y a lieu de se demander si les phénomènes que nous avons décrits appartiennent en propre à cette affection et s'il n'existerait pas de phénomènes analogues, à l'état normal de l'organisme, et dans d'autres états pathologiques?

Voyons tout d'abord comment se fait la régénération du sang dans les conditions normales.

L'étude de notre observation nous a montré que, dans l'anémie de Banti, le processus de destruction des érythrocytes est augmenté et que ce processus existe aussi chez l'homme sain, mais que, chez ce dernier, il est lent, si bien que la déperdition de l'organisme en globales rouges détruits par les érythrophages est contre-balancée ici par l'activité incessante, bien que relativement faible, des organes hématopoiétiques.

Passant maintenant à l'étude des organes normaux dans lesquels se détruisent les globules rouges et où sont résorbés les produits de cette destruction, c'est-à-dire de la rate et du foie, nous devons tout d'abord remarquer que tous les histologistes, sans exception, décrivent, dans la pulpe de la rate et dans ses voies sanguines, des cellules volumineuses, appelées cellules « spléniques » par la majorité des auteurs, dont beaucoup contiennent des globules rouges ou leurs fragments. A l'examen microscopique, on peut facilement, sans être histologiste de profession, trouver ce genre de cellules dans chaque rate. Il suffit pour cela de les chercher attentivement, surtout sur des préparations fixées au moyen d'un liquide autre que la formaline. Il est vrai que, dans les conditions normales, ces cellules ne sont pas nombreuses. Néanmoins, sur une coupe microscopique on peut toujours en compter une dizaine. Ces cellules ne sont autre chose que nos érythrophages qui happent les globules rouges soit pour les digérer sur place, dans la rate elle-même (qui contient toujours de l'hémosidérine), soit pour les transporter au foie où ils se détruisent complètement et cèdent aux cellules hépatiques,

pour l'élaboration de la bile, les produits de désintégration des globules rouges.

Les érythrophages se trouvent aussi dans le foie. Quincke dit que les leucocytes du sang englobent les érythrocytes dans les capillaires hépatiques, mais il s'agit ici, sans doute, non pas de leucocytes, mais d'érythrophages provenant de la rate. A un examen attentif, on découvre des érythrophages dans chaque foie, surtout si avant de colorer la préparation on fait l'épreuve de la réaction du fer : on voit alors apparaître dans les capillaires des points bleus qui trahissent aussitôt la présence de ces étranges cellules.

Ainsi donc, même dans les conditions normales, la destruction des globules rouges se fait surtout par les érythrophages qui happent dans la rate ces éléments figurés, les digèrent, et se détruisent en partie dans cet organe, mais dont la plupart sont apportés par le torrent circulatoire sanguin au foie où ils adhèrent, comme nous l'avons dit, aux parois des capillaires des parties périphériques des lobules hépatiques et réalisent de la sorte les conditions nécessaires à la rétention des globules rouges dans le foie. Sans cette rétention d'érythrocytes, on ne saurait expliquer leur absorption par les cellules du foie, la circulation du sang dans cet organe ne s'interrompant pas, alors même qu'elle serait ralentie. Ainsi s'effectue la destruction de globules rouges dans les conditions normales. Il n'y a donc, comme nous l'avons déjà fait ressortir, aucune raison d'admettre, en se plaçant au point de vue purement physique, que seuls les érythrocytes mourants seraient détruits de cette façon. C'est la moelle osseuse qui, dans les conditions normales comme dans les conditions pathologiques, est chargée (chez l'adulte) de la réparation de ces pertes, mais, n'ayant pas de surcroît de travail, elle ne subit pas de transformation lymphoïde.

Et c'est ainsi que l'étude de la maladie de Banti nous a permis d'élucider une question demeurée jusqu'ici obscure, celle du mécanisme de la destruction de globules rouges dans les conditions normales et dans les anémies primitives.

Le mérite de Banti est d'avoir indiqué le lien clinique unissant l'anémie, la splénomégalie et la cirrhose du foie. Pour notre part, nous pûmes, comme nous le croyons, établir entre

ces trois manifestations cliniques une corrélation physiologique intime. Nous avons constaté, en effet, que, dans certaines conditions, il se produit dans la rate une absorption excessive de globules rouges par des cellules particulières, ce qui engendre l'anémie. D'autre part, la destruction massive de ces cellules et de leur contenu engendre, dans la rate, la splénomégalie et, dans le foie, d'énormes dépôts de fer et la cirrhose; parfois elle produit aussi l'ictère. La moelle osseuse devient rouge, lymphoïde et répare, comme elle le peut, la déperdition excessive en globules rouges.

Mais étant donnée la connexion intime entre l'anémie et la cirrhose hépatique dans la maladie de Banti, il y a lieu de se demander si les autres cirrhoses ne seraient pas également dues à une destruction excessive de globules rouges dans le foie?

Comme nous l'enseigne la pathologie (Ziegler, *loc. cit.*), dans un foie atteint de cirrhose, notamment dans les parties périphériques de ses lobules, on trouve de grands dépôts de fer (hémosidérine). Ziegler (p. 688) fait même observer que cette maladie est liée à une destruction excessive d'éléments figurés du sang.

D'autre part, des travaux de Rosenstein (6) et de Vlaïev (7) il résulte que, dans les cirrhoses du foie, le nombre des globules rouges est diminué. Nous avons eu récemment l'occasion d'examiner le sang d'un cirrhotique, avec ascite manifeste, chez lequel on comptait 4.800.000 globules rouges et 50 p. 100 d'hémoglobine. On trouvait dans le sang des formes incomplètement développées d'érythrocytes : cyanophiles, globules difficilement colorables, macrocytes, microcytes et poikilocytes, ces derniers en petite quantité. La faible diminution du nombre d'érythrocytes dans ce cas, jointe à l'amoindrissement de la teneur en hémoglobine, pouvait dépendre d'un épaississement du sang par transsudation abondante dans la cavité abdominale. Grawitz (8) cite le cas d'un cirrhotique dont le sang devint pauvre en globules rouges lorsque, après ponction de l'ascite, il se fluidifia par le rétablissement de la circulation.

Bleichrœder (9) a montré que, dans les cirrhoses du foie comme dans les anémies, la moelle osseuse devient rouge; autrement dit, passe de l'état de repos à l'état d'activité.

Dans toute cirrhose hépatique, les altérations de la rate sont des plus caractéristiques et la splénomégalie est un phénomène constant. Ces altérations ne dépendent nullement d'une congestion. Voici quelle est la différence entre une rate simplement congestionnée et une rate cirrhotique.

La rate congestionnée est dure, couleur rouge-cerise, ses trabécules sont bien apparents, la pulpe ne se laisse pas enlever par le raclage. L'organe est quelque peu augmenté de volume, mais souvent il est, au contraire, légèrement atrophié. La rate cirrhotique est généralement grosse, parfois très volumineuse; sa pulpe est molle, rouge claire, elle s'enlève facilement par le raclage de la surface des coupes, elle est hyperplasiée. A l'examen microscopique (Bleichrœder, *loc. cit.*, p. 447), la rate congestionnée se distingue de la rate cirrhotique en ce que la première est toujours gorgée de sang, tandis que, dans la seconde, la pulpe est souvent relativement pauvre en liquide sanguin. La rate cirrhotique contient infiniment plus de pigment donnant la réaction du fer, d'où cette conclusion que, dans les cirrhoses du foie, il se produit dans la rate une forte destruction de globules rouges. Bleichrœder a constaté aussi dans la rate cirrhotique — à l'encontre de ce qu'on observe dans la rate congestionnée — beaucoup de cellules se colorant par le triacide en un rouge foncé homogène. Des cellules semblables existent, d'après cet auteur, dans la rate normale, mais on les trouve surtout dans la rate de sujets atteints de fièvre typhoïde ou d'autres maladies infectieuses. Ces cellules sont situées, en partie, parmi les éléments de la pulpe splénique, mais plutôt dans les veines et les sinus sanguins de la rate. Elles s'accumulent parfois en telle quantité qu'elles rappellent alors les « proliférations sarcomoïdes des cellules de la rate ». L'auteur n'insiste pas sur la description du protoplasma de ces éléments, et ne dit rien des inclusions intracellulaires. Mais il les identifie avec les cellules que Mme Borissova (10) a trouvées en abondance dans la maladie de Banti et dans deux cas de splénomégalie. Ce dernier auteur a noté aussi la présence de globules rouges ou de leurs débris à l'intérieur de ces cellules.

Malheureusement, nous ne possédons pas de telles préparations de rate cirrhotique. Aussi ne pouvons-nous pas confirmer, pour notre part, le fait de la présence d'érythrophages dans la

rate de ces malades. Toutefois, nous fondant sur les travaux précités, nous sommes convaincus que les érythrophages s'y développent. Nous les avons vus, du moins, sur toutes nos anciennes préparations provenant de cirrhoses hépatiques. Or, comme je l'ai montré, les érythrophages ne peuvent pénétrer dans le foie que venant de la rate. Le tableau histologique de la cirrhose du foie est identique à celui que nous avons décrit pour la maladie de Banti. On trouve des érythrophages dans toute cirrhose du foie, atrophique ou hypertrophique.

Ces altérations de la rate ne sont pas, d'après Bleichrœder, l'apanage exclusif des cirrhoses. Bleichrœder les a trouvées régulièrement dans la rate des anémiques, notamment dans l'anémie pernicieuse. Il dit (p. 448): « La rate dans la cirrhose du foie présente une certaine ressemblance avec la rate dans les maladies du sang. »

Ainsi donc, dans les cirrhoses du foie, on constate tous les symptômes caractéristiques de la maladie de Banti, à savoir :

1° Anémie (quantitative et qualitative);

2° Splénomégalie précédant la cirrhose hépatique;

3° Prolifération du tissu conjonctif du foie;

4° Moelle osseuse rouge.

Les altérations microscopiques de la rate et du foie sont, comme nous l'avons vu, identiques dans les deux formes de la maladie. Si l'on apprécie la valeur de tous ces symptômes morbides, on trouve que, cliniquement, la différence entre ces deux affections n'est que quantitative. Dans la maladie décrite par Banti, en effet, les lésions hépatiques n'apparaissent qu'à la période ultime ; dans la cirrhose du foie, au contraire, les phénomènes morbides du côté de cet organe prédominent de bonne heure. Il y a donc entre ces deux affections identité de cause et de nature. L'anémie de Banti, comme la cirrhose du foie, est le résultat d'une activité excessive des érythrophages intraspléniques qui dévorent en masse les globules rouges dont la destruction dans la rate provoque une augmentation du volume de cet organe. D'autre part, la destruction massive et complète des érythrophages dans le foie, notamment dans les parties périphériques de ses lobules, amène l'irritation et la prolifération du tissu conjonctif de la capsule de Glisson. Quant à l'ictère — qui n'est pas obligatoire — il s'explique par

la destruction, dans les capillaires du foie, d'érythrophages ayant déjà reçu de la bile des cellules hépatiques. Enfin, la moelle osseuse devient rouge pour suppléer aux pertes immenses en globules rouges.

De cette façon, les cirrhoses du foie résultent de l'anémie, et les altérations viscérales des cirrhotiques sont pareilles à celles qui se produisent dans les anémies primitives. On peut aussi en conclure inversement que *toute anémie primitive, liée à une destruction excessive de globules rouges par les érythrophages, peut aboutir à une cirrhose du foie*, s'il se produit dans cet organe une destruction massive d'érythrophages pendant une période de temps plus ou moins prolongée.

Et alors il est logique d'admettre que, *dans les maladies accompagnées d'anémie* et au cours desquelles on voit parfois se développer la cirrhose hépatique, *il y a aussi érythrophagie*, c'est-à-dire absorption excesssive de globules rouges par les cellules de la rate et leur destruction dans les capillaires du foie.

On peut classer dans ce groupe la tuberculose et la syphilis.

On sait que l'anémie est un phénomène constant à toutes les périodes de la tuberculose (Grawitz, *loc. cit.*) et dans les manifestations syphilitiques [Zélénev (11)]. D'autre part, tout le monde sait que, dans la syphilis, le foie est très souvent atteint, parfois cirrhotique. Bartel et Neumann (12), en étudiant l'influence exercée par l'appareil lymphatique sur la virulence des bacilles de la tuberculose, ont montré que lorsque l'atténuation de cette virulence peut être obtenue, les animaux ne prennent pas l'infection tuberculeuse générale, mais *présentent des lésions cirrhotiques du foie, sans tuberculose*. Ces expériences furent répétées maintes fois, et le professeur Orth montre souvent à ses élèves comment, sous l'influence de l'infection tuberculeuse, on voit se produire une cirrhose hépatique. Mouisset et Bonnamour (13) établissent ainsi une corrélation entre les lésions tuberculeuses des viscères et les cirrhoses du foie. Dans les vingt années de ma pratique anatomo-pathologique, j'eus l'occasion de faire des milliers d'autopsies de tuberculeux et je puis affirmer que, très souvent, je notais soit des craquements à la coupe du foie, soit une cirrhose avérée de cet organe. On en trouve la preuve

dans chaque volume de notre collection de comptes rendus d'autopsies.

Le tuberculeux a toujours la rate plus ou moins grosse, hyperplasique (la pulpe s'enlève facilement par le raclage de la surface de section), et, parfois, il y a chez lui splénomégalie manifeste.

Ainsi donc, dans la tuberculose comme dans la syphilis (au cours de ces manifestations, s'entend), on constate toujours des signes d'anémie et assez souvent des lésions cirrhotiques du foie avec hypertrophie plus ou moins accusée de la rate. On peut donc admettre l'existence, dans ces affections, d'une érythrophagie excessive. Or, dans le premier cadavre de tuberculeux que j'eus l'occasion d'examiner en ce sens (c'était une tuberculose ulcérée des poumons chez un jeune homme non encore épuisé), je trouvais des lésions dépassant toute attente. Les microphotogrammes de ces préparations de rate et de foie sont des plus concluants : la destruction de globules rouges dans la rate et l'abondance des érythrophages dans le foie sont ici plus accusés que dans mon observation d'anémie de Banti. La moelle osseuse est rouge, hyperplasique, signe manifeste d'une déperdition considérable en globules rouges.

Dans un cas suivant de tuberculose pulmonaire galopante, l'examen décela les mêmes lésions de la rate et du foie avec cette particularité remarquable que, dans ces deux organes, dont le premier était doublé de volume, on trouvait des tubercules miliaires nécrosés, pour la plupart, et ne contenant pas de cellules géantes. Ces tubercules étaient si petits qu'on ne les apercevait qu'à l'examen microscopique. Presque tous les tubercules de la rate étaient entourés de cellules gorgées de globules rouges. Ces érythrophages formaient une ceinture presque ininterrompue de plusieurs rangées, comme s'ils protégeaient les tissus contre le foyer tuberculeux.

Les érythrophages sont donc de véritables phagocytes dans le sens de Metchnikoff. Ils ont la faculté d'absorber non seulement les globules rouges du sang, mais aussi des substances hétérogènes à l'organisme (encre de Chine, carmin, grains de charbon ou de pigment, plasmodies de la malaria, bacilles tuberculeux, spirochètes pâles, etc.). Ils prennent part à la lutte de l'organisme contre l'infection et ils se multiplient sous l'in-

fluence de l'action exercée par le poison sur les éléments servant à la formation de ces phagocytes (corpuscules de Malpighi de la rate et ganglions lymphatiques). Et comme ces étonnantes cellules ont la propriété de happer tout ce qui nage librement dans les tissus de la rate, elles absorbent tout d'abord et le plus facilement les éléments figurés du sang, érythrocytes et leucocytes. A l'intérieur de certains érythrophages, on peut trouver des microbes ayant l'apparance de bacilles tuberculeux. Le professeur Nikiforov (14) put y constater des spirochètes du typhus récurrent. D'ailleurs, nous n'avons pas encore eu le temps de nous occuper spécialement des phénomènes de phagocytose par érythrophagisme dans les maladies infectieuses, et nous pouvons dire seulement que l'anémie des tuberculeux avec ses conséquences est l'effet d'une action secondaire, peut-être nocive à l'organisme, des phagocytes, qui, eux aussi, happent les globules rouges, cette propriété leur étant inhérente en leur quatité de « phagocytes à tout faire ». Elle s'exerce fatalement chaque fois que l'organisme, sous l'influence de la toxine tuberculeuse et comme moyen de défense, fait intervenir, pour la lutte contre l'infection, ces éléments qui agissent autant en absorbant les agents infectieux qu'en sécrétant des antitoxines extra-cellulaires.

Comme il est facile de le comprendre, pareille stase périphérique ne se produit guère autour des tubercules du foie. Ici les cellules remplies de globules rouges se trouvent dans les capillaires hépatiques, accolées à leurs parois et ne pouvant plus exercer d'action phagocytaire. En plus, ils s'y détruisent très rapidement avec tout leur contenu, peut-être aussi avec l'agent infectieux, bacilles tuberculeux, spirochètes pâles, etc., sous l'influence des sucs cellulaires du foie.

Par insuffisance de cadavres, nous ne pûmes vérifier si l'anémie syphilitique est également le résultat d'une érythrophagie excessive dans la rate, mais sur des préparations microscopiques de cirrhose syphilitique du foie (de notre collection) les érythrophages abondent dans les capillaires hépatiques, tout comme dans la tuberculose et les cirrhoses du foie. Il s'ensuit que, chez les syphilitiques également, les érythrophages de la rate se trouvent dans un état de suractivité.

Mais il faut cependant admettre la possibilité d'une anémie

d'origine splénique dans la tuberculose ou dans la cirrhose du foie, alors même que, sur le cadavre, on ne constate pas de phénomènes d'absorption de globules rouges. Ce sont les cas où l'organisme renonce à toute lutte, où il ne se produit plus de phénomènes réactionnels, causes de lésions anatomo-pathologiques qu'on constate à l'autopsie.

Récemment nous avons pu observer deux cas de ce genre. Dans l'un où la mort survint par pneumonie fibrineuse, nous trouvâmes, par hasard, à l'autopsie, une cirrhose atrophique manifeste du foie, sans augmentation sensible de la rate, sans ascite. C'était le cadavre d'un vieil homme extrêmement épuisé (« rien que la peau et les os », dit le compte rendu de l'autopsie). Il existait un léger ictère. Dans les produits de raclage du foie et de la rate, nous ne pûmes déceler d'érythrophages. La moelle osseuse était rouge et gélatiniforme dans tous les os longs, elle s'écoulait en gelée de la surface de l'os sectionnée à la scie. Une moelle osseuse aussi complètement épuisée ne saurait, sans doute, suppléer à la perte en éléments figurés du sang, bien qu'il n'y eût plus de destruction de globules rouges dans la rate et dans le foie. L'anatomie pathologique nous enseigne que la dégénérescence mucoïde de la moelle osseuse se montre dans les états de marasme extrême.

Une seconde fois, nous constatâmes l'absence d'érythrophages à l'autopsie d'un tuberculeux en état de profond marasme, avec transformation fibrineuse et caséeuse de la totalité du tissu pulmonaire. Rate peu augmentée de volume, mais très dure et fibreuse. Foie anémique. Pas d'érythrophages dans ces organes. Moelle des os gélatineuse.

Ces résultats négatifs en ce qui concerne l'érythrophagie ne sauraient, bien entendu, ébranler nos conclusions étayées sur des faits. Tout au contraire, ils ne font que les confirmer et montrent seulement que les processus réactionnels s'achèvent lors des derniers jours de la vie, de telle sorte que, sur le cadavre, on ne voit que leurs conséquences. La cause productrice des lésions anatomiques une fois disparue, l'organisme perd son moyen de défense et succombe.

Les faits de ce genre doivent être pris en considération par ceux qui voudraient bien contrôler mes recherches.

On sait que la cirrhose du foie s'observe le plus souvent chez

les alcooliques. Tout le monde s'accorde à dire que les vrais ivrognes sont anémiques, et les cliniciens affirment que « chez les alcooliques on peut trouver une grosse rate bien avant l'apparition de la cirrhose du foie, laquelle parfois ne se produit point » [M. Roche (15)]. En présence de ces faits, nous sommes autorisés à placer l'alcool dans le groupe des poisons qui engendrent la cirrhose du foie en agissant sur les tissus de cet organe non pas directement, mais par l'intermédiaire des érythrophages de la rate. Ils se multiplient énormément chez les alcooliques et sont transportés dans le foie pour s'y détruire et y provoquer une irritation du tissu conjonctif interlobulaire avec ses conséquences. Et si tout alcoolique n'est pas atteint de cirrhose du foie, cela tient, d'une part, aux particularités individuelles (un tel a un foie vulnérable, un autre l'a plus résistant), et, d'autre part, il est possible que, chez certains sujets (comme chez les animaux intoxiqués chroniquement par ces poisons anémiants), les érythrophages soient si instables que la plupart d'entre eux se détruisent déjà dans la rate. Il n'en pénètre donc dans le foie qu'un nombre minime, insuffisant à provoquer des phénomènes inflammatoires.

Nous n'hésitons pas à affirmer que *toute cirrhose du foie* — et non seulement la cirrhose d'origine splénique, comme le pense Bleichrœder (*loc. cit.*, p. 455) — *résulte d'une anémie par l'effet de substances toxiques, soit exogènes* (alcool, malaria, syphilis, tuberculose, fièvre typhoïde, etc.), *soit endogènes*, comme dans certains troubles digestifs, car on sait que, dans la cirrhose du foie de même que dans d'autres anémies, on trouve constamment des altérations plus ou moins apparentes de l'estomac et de l'intestin. Bleichrœder (*loc. cit.*), se basant sur des faits consignés dans la science, attire l'attention sur l'analogie entre les maladies du sang et les cirrhoses du foie au point de vue des altérations qu'elles engendrent dans certains organes.

Il est encore une maladie liée intimement, d'une part, à la cirrhose du foie et, d'autre part, aux anémies.

C'est la splénomégalie que Gaucher (16) a décrit, le premier, en 1882.

Nous avons déjà dit que la splénomégalie accompagne presque constamment la cirrhose du foie. Elle est particulière-

ment manifeste dans la cirrhose dite hypertrophique où la rate est parfois si volumineuse qu'on pourrait parler d'hypersplénomégalie. Nous avons aussi établi la relation entre l'anémie et les cirrhoses du foie.

Gaucher voulait d'abord faire de la splénomégalie primitive une entité clinique nouvelle, mais, en analysant son observation, il constata, en plus de l'augmentation du volume de la rate, de l'anémie progressive, des ecchymoses, de la pigmentation de la peau, du dermaphéisme, des épistaxis, des hémorragies gingivales et d'autres signes d'anémie grave. Le foie était tuméfié ; à l'autopsie, la rate pesait 4.770, le foie 3.480 grammes, et il y avait cirrhose hépatique manifeste.

D'autres auteurs [Collier, Picou et Ramond, Bowaird, Brill et le professeur Schlagenhaufer (17)], décrivant, après Gaucher, leurs observations de splénomégalie, indiquent la constance, dans cette affection, d'une anémie qui se traduit par une réduction à 1.302.000 du nombre des globules rouges (Picou et Ramond), avec diminution d'hémoglobine à 58 p. 100 (Schlagenhaufer).

La moelle osseuse était constamment rouge et le foie, augmenté de volume dans la plupart des cas, présentait toujours une prolifération plus ou moins accusée du tissu conjonctif.

On voit que la splénomégalie de Gaucher s'accompagne d'anémie, de lésions cirrhotiques du foie et d'hyperplasie de la moelle osseuse. On ne saurait donc considérer cette affection comme une entité clinique à part.

Tous les auteurs qui ont fait l'examen histologique des viscères dans la splénomégalie de Gaucher ont noté, dans la rate, dans le foie, dans quelques ganglions lymphatiques et dans la moelle osseuse, nombre de grosses cellules épithélioïdes à petit noyau, parfois à plusieurs noyaux, avec protoplasma vacuolisé, les vacuoles étant, pour la plupart, d'égales dimensions (vacuolisation en rayons de miel, wabige Vacuolisation).

Dans son mémoire sur la splénomégalie, Schlagenhaufer donne d'excellents dessins de la rate et d'un ganglion lymphatique. Il dessine une masse de grosses cellules ne différant guère de nos érythrophages et situées, pour la plupart, à l'intérieur des sinus et des veines. Je me permets de les reproduire ici (fig. 7 et 8), à titre de comparaison avec mes figures, afin

que chacun puisse se convaincre de leur ressemblance avec les érythrophages.

Schlagenhaufer et d'autres ne trouvèrent pas de globules rouges dans le protoplasma de ces cellules. Les inclusions ne seraient, d'après eux, que l'effet d'une vacuolisation, puisque, disent-ils, — et c'est là leur propre argument, — l'hémoglobine a été extraite des globules rouges par la formaline (Schlagenhaufer conservait ses préparations par le procédé de Kaiserling).

Gaucher (*loc. cit.*) tient ces cellules pour de l'épithélium, et il estime qu'on a affaire ici à un épithélioma primitif de la rate. Bowaird parle d'hyperplasie endothéliale de la rate.

Les auteurs ont constaté la présence de cellules toutes pareilles dans les ganglions lymphatiques, dans la moelle osseuse et même dans le foie, où elles s'accumulent par groupes et sont si serrées qu'il « est difficile de les délimiter entre elles » (Schlagenbaufer, *loc. cit.*, p. 131). Nous estimons que ces difficultés, dans l'examen des tableaux microscopiques du foie, sont précisément la cause de ce que les auteurs ne s'aperçurent point de la présence, dans les capillaires des parties périphériques des lobules hépatiques, d'amas d'érythrophages situés pour la plupart le long des parois vasculaires et figurant comme des prolongements des trabécules du foie. Pareille erreur peut, en effet, se produire lorsque les préparations n'ont pas subi de traitement approprié.

Dans la splénomégalie de Gaucher, on constate, comme nous l'avons montré, le même processus d'absorption de globules rouges par les érythrophages de la rate, leur désintégration partielle dans cet organe (les auteurs notent la présence de fragments d'hémosidérine dans la rate) et leur transport par le torrent circulatoire au foie où ils sont complètement détruits. La destruction en masse de ces éléments à la périphérie des lobules hépatiques provoque, dans certains cas, ainsi que nous l'avons vu, une irritation du tissu conjonctif interlobulaire avec cirrhose consécutive.

Il s'ensuit que la splénomégalie ne diffère en rien des cirrhoses hépatiques et qu'elle relève de la même cause, de l'anémie résultant d'une destruction excessive de globules rouges par les érythrophages. Et comme, dans la plupart des

cas décrits, la splénomégalie s'accompagnait de lésions tuberculeuses viscérales, il faut admettre que, dans la majorité des cas de splénomégalie dite primitive, c'est, en réalité, la toxine tuberculeuse qui est cause de la suractivité des érythrophages. Il doit en être de même, dans certains cas du moins, pour les autres poisons dont il a été question.

(*A suivre.*)

EXPLICATION DES PLANCHES I et II

Fig. 1. — Trois érythrophages à l'intérieur d'une veine de la rate, dans la maladie de Banti : deux d'entre eux renferment des globules rouges, le troisième contient un mononucléaire. Grossissement 120 : 1.

Fig. 2. — Même préparation à un grossissement moyen.

Fig. 3. — Erythrophages des capillaires du foie dans la maladie de Banti.

Fig. 4. — Erythrophages du foie en solution physiologique.

Fig. 5 et 5 *a*. — Erythrophages de la rate dans la tuberculose pulmonaire.

Fig. 6. — Erythrophages du foie d'un tuberculeux pulmonaire. Microphotogramme d'après une préparation fixée par le procédé de Koultchitzki et coloré par la Wasserblau-Eosine.

Fig. 7. — Erythrophages de la rate dans la splénomégalie de Gaucher. Dessin appartenant au professeur Schlagenhaufer et donné dans les *Virchow's Arch.*, v. 187.

Fig. 8. — Erythrophages d'un ganglion lymphatique dans la splénomégalie primitive. Dessin de Schlagenhaufer, tiré du *Virchow's Arch.* v. 187.

Fig. 9. — Erythrophage de la rate d'un lapin intoxiqué par la pyrodine.

Fig. 10. — Multiplication (mitose) d'éléments lymphoïdes des corpuscules de Malpighi de la rate d'un lapin, sous l'influence de la pyrodine.

Fig. 11. — Transformation en érythrophages d'éléments lymphoïdes des corpuscules de Malpighi.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE FÉVRIER 1912 N° 2

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LORD LISTER

(1827-1912)

Lord Lister, le rénovateur de la chirurgie, est mort le 11 février dernier. Son nom évoque la révolution apportée, il y a quarante-cinq ans, par le pansement antiseptique. Jusqu'à Lister, les infections, à la suite des interventions chirurgicales, étaient si fréquentes, que la vie de tout opéré était menacée et que l'essor de la Chirurgie était arrêté.

Eviter l'infection post-opératoire a été de tout temps la préoccupation des chirurgiens. Que de procédés, que de pansements ont été proposés dans ce but, sans résultat certain ! La chirurgie est restée impuissante contre les infections tant qu'elle n'a pas eu de doctrine capable d'expliquer la cause de celles-ci. Lister lui en donna une. Homme de science au courant de toutes les découvertes, et expérimentateur lui-même, il étendit à la chirurgie la théorie des germes que Pasteur venait d'établir par l'étude des fermentations. Convaincu que ce sont les infiniment petits qui provoquent les infections, Lister empêche leur culture à la surface des plaies au moyen des antiseptiques. Grâce au pansement phéniqué, son service de Glascow offrait le spectacle, merveilleux en 1869, d'opérés guérissant sans suppuration et sans fièvre.

Débarrassés de la crainte des infections, les chirurgiens entreprennent des opérations auxquelles ils n'auraient jamais osé songer avant l'ère Listérienne. Dès lors, la chirurgie commence son développement triomphal.

Lister avait emprunté sa doctrine à la bactériologie, il a payé sa dette en ralliant à cette science une foule de partisans. Comment en effet ne pas reconnaître la vérité de la théorie microbienne, quand sa première application à l'art de guérir épargnait des milliers de vies humaines et rénovait la Chirurgie ?

C'est un devoir pour les disciples de Pasteur de rendre, dans ces Annales, un suprême hommage à celui qui a su tirer de l'œuvre de leur maître un si grand bienfait pour l'Humanité.

LES FACTEURS DE TOXICITÉ DES BACTÉRIES

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

ÉTUDE DES BACILLES DE PREISZ-NOCARD

par M. NICOLLE, G. LOISEAU et P. FORGEOT

Les bacilles de Preisz-Nocard jouissent d'une grande ubiquité et leur rôle pathogène apparaît de jour en jour plus important. Ils s'attaquent à diverses espèces animales, occasionnant : chez le cheval, l'acné contagieuse, la lymphangite ulcéreuse, des abcès rénaux... ; chez le mouton, une véritable pseudo-tuberculose, des altérations caséeuses viscérales et ganglionnaires... ; chez le bœuf et le porc, des lésions diverses. M. Truche les a rencontrés récemment chez le lapin (abcès « spontanés »). Il serait intéressant de les rechercher chez l'homme, où tout porte à croire qu'on les trouverait.

Nous avons eu entre les mains un nombre considérable d'échantillons de bacilles Preisz-Nocard d'origine équine et ovine ; les uns isolés par MM. Panisset et Cesari ainsi que par nous-mêmes, les autres dus à l'obligeance de M. Carré. Ces échantillons se classent en *deux catégories bien tranchées*, *germes virulents* et *germes avirulents*, vis-à-vis du cobaye pris comme animal réactif. Les avirulents n'ont jamais manifesté de toxicité (neutralisable par le sérum spécifique) ; les virulents, plus ou moins toxiques sur les milieux solides, formaient dans les liquides une quantité de « poison soluble » qui n'allait pas régulièrement de pair avec leur toxicité individuelle.

Comme pour notre mémoire précédent (1), nous nous trouvons en face des deux questions suivantes :

(1) Étude des bacilles diphtériques. — Ces *Annales*, février 1911.

1° Le poison des bacilles est-il identique à celui des filtrats?

2° Quel est le degré et le mode de toxicité du bacille lui-même, c'est-à-dire de sa « substance fondamentale »?

Voici le « matériel biologique » employé à résoudre ce double problème.

1° *Toxine soluble.* — Nous prendrons comme type le filtrat (sur bougie) de l'échantillon dit Panisset (isolé d'un abcès du rein, chez le cheval). Les meilleurs résultats ont été fournis par le *milieu de culture* suivant.

On mêle de la viande de cheval hâchée avec le double de son poids d'eau; on porte cinq minutes à l'ébullition; on filtre sur papier et on additionne ($\overline{aa}$) le filtrat de « bouillon de panse » (préparé selon la formule du Dr Louis Martin et couramment employé, ici, dans la préparation de la toxine diphtérique); on alcalinise franchement au tournesol; on chauffe à 120 degrés; on répartit en ballons; on stérilise à 115 degrés.

Le poison obtenu offre une activité sensiblement égale à celle dont parle Carré (1). Le maximum est atteint après sept jours d'étuve; il tue alors les cobayes de 500-600 grammes, en douze-vingt-quatre heures, sous le volume de 1 cent. cube à 0,1 cent. cube. Nous ne nous sommes pas efforcés de trouver une toxine plus forte, superflue pour le but que nous nous proposions. Rien ne prouve, d'ailleurs, que les bacilles Preisz-Nocard soient susceptibles de la produire.

2° *Bacilles atoxiques.* — Nous possédons plusieurs échantillons de cette catégorie, tous identiques. L'un d'eux, « Champion », isolé par M. Carré chez la brebis (abcès ganglionnaire), sera pris comme type de description.

3° *Bacilles toxiques.* — Nous en avons eu *autant que nous désirions*, grâce surtout à l'obligeance de M. Cesari, qui voulait bien les isoler de son riche matériel de l'abattoir Brancion. Ces bacilles étaient constamment virulents. La virulence se traduisait par les réactions caractéristiques : abcès (inoculation sous-cutanée), vaginalite (inoculation intrapéritonéale), éruption pustuleuse généralisée (inoculation intraveineuse), très complètement étudiées par M. Panisset sous les yeux de l'un de nous et décrites en détail dans ces *Annales* (juin 1910). La toxicité n'affecte aucun rapport régulier avec la virulence :

(1) *Revue gén. de méd. vét.*, t. IV, 1908.

loin de là. — L'échantillon Panisset sera pris comme type de description, pour les germes toxiques.

4° *Bacilles toxiques et atoxiques, tués par l'alcool-éther.* — Dans nos recherches sur les facteurs de toxicité des bacilles diphtériques, les germes atoxiques vivants nous ont servi à établir les propriétés de la substance fondamentale du microbe de Löffler et les filtrats de cultures toxiques celles du « poison soluble », caractéristique du même microbe. Nous savions donc, *d'avance*, ce que donnerait l'inoculation des germes toxiques vivants, puisqu'ils ne se multiplient ni sous la peau ni dans le système circulatoire où nous les introduisions — et l'expérience a justifié schématiquement nos prévisions.

Avec les bacilles Preisz-Nocard, il était également très facile de deviner ce que donnerait l'inoculation de germes toxiques, *vivants mais avirulents*, connaissant les propriétés de la substance fondamentale (germes atoxiques vivants) et du « poison soluble » (filtrats de cultures toxiques). Malheureusement, nous n'avons jamais rencontré de tels germes : on vient de le mentionner tout à l'heure. Il fallait donc éliminer la virulence en conservant, dans une mesure convenable, la propriété toxique; c'est-à-dire tuer les bacilles sans trop les altérer. Nous nous sommes arrêtés à l'emploi de l'alcool-éther ($\overline{aa}$), prolongé pendant vingt-quatre heures et suivi de dessiccation (vide sulfurique). Ainsi qu'on devait s'y attendre, les microbes soumis à ce traitement sont beaucoup moins actifs que les microbes vivants; mais les différences d'activité demeurent constantes entre les spécimens examinés et c'est là tout ce que nous demandions. Nous n'avons donc pas cherché à obtenir des produits plus toxiques, soit en diminuant le temps d'action de l'alcool-éther, soit en expérimentant d'autres moyens. La comparabilité des recherches importait seule; aussi le traitement par l'alcool-éther a-t-il toujours été réalisé dans les mêmes conditions, qu'il s'agît de l'échantillon Panisset ou d'échantillons différents.

On se rendra compte de la nécessité d'éliminer la virulence quand on aura vu combien le tableau de l'infection apparaît complexe et combien il serait téméraire de vouloir l'interpréter sans une étude préalable des bacilles toxiques et avirulents. Mais ceux-ci étant créés artificiellement par l'action de

l'alcool-éther, il fallait, à titre de comparaison, posséder également des bacilles atoxiques « alcool-éther »; d'où l'obligation d'agir avec le type Champion comme avec le type Panisset.

5° *Sérum Carré.* — Obtenu en injectant au cheval la toxine soluble d'un germe d'origine ovine et mis gracieusement à notre disposition par M. Carré, que nous ne saurions trop remercier de l'obligeance avec laquelle il a secondé nos études.

6° *Sérums de chevaux chroniquement infectés.* — Comme nous le verrons plus loin, *ces sérums* (au moins tous ceux étudiés jusqu'ici) *jouissent d'un pouvoir antitoxique indéniable*, souvent égal et parfois supérieur à celui du sérum Carré. *D'où une méthode nouvelle de diagnose* (*toxino-diagnostic*), aussi nette dans ses résultats que simple dans son application.

[Par contre, le sérum antidiphtérique demeure aussi inefficace que le sérum normal de cheval, vis-à-vis de la toxine des bacilles Preisz-Nocard. On ne s'en étonnera guère quand on aura vu combien les deux poisons, diphtérique et Preisz-Nocard, diffèrent profondément l'un de l'autre.]

Pour ce qui concerne la *culture des germes* envisagés, les *animaux d'expérience*, les *voies d'introduction de la toxine et des bacilles*, nous renvoyons textuellement à notre précédent travail. Comme dans celui-ci, deux grandes divisions s'imposent : étude des injections sous-cutanées et étude des injections intraveineuses.

ÉTUDE DES INJECTIONS SOUS-CUTANÉES

Toxine soluble.

Nous avons administré des doses régulièrement décroissantes, échelonnées entre 5 cent. cubes et 0,1 cent. cube (il n'est question, ici, que des filtrats les plus toxiques). Les lésions observées appartiennent incontestablement, comme on le verra, au type *eschare humide*. En réalité, il s'agit de la moins humide des altérations de ce genre, bien éloignée de celle que détermine, par exemple, le suc pancréatique actif (1), encore plus

(1) M. Nicolle et Pozerski. — Ces *Annales*, avril 1911.

distante de la forme hémorrhagique caractéristique des venins de vipéridés. Mais, d'autre part, la différence avec l'eschare sèche de la toxine diphtérique est aussi profonde que celle qui sépare la mortification due aux alcalis, même assez dilués, de la mortification due aux acides. Il va de soi qu'à la période humide initiale fait suite une période de dessiccation secondaire et obligée ; tellement obligée, que la persistance de l'humidité, au delà des limites normales, constitue le signe pathognomonique d'une infection surajoutée (infection à *pasteurella*, le plus souvent).

Au-dessus de 0,2 cent. cube (environ), la mort vient interrompre le cours des accidents, d'autant plus vite, naturellement, que l'on se rapproche davantage de 5 cent. cubes. De 0,2 à 0,1 cent. cube (environ), l'animal survit régulièrement et l'évolution locale suit son cours régulier, en trois périodes bien définies : *période d'eschare humide*, n'excédant jamais les vingt-quatre premières heures ; *période d'eschare sèche*, durant en moyenne quarante-huit heures ; *période de réparation*, annoncée par la chute de l'eschare et aboutissant à la cicatrisation après huit-dix jours. Par conséquent, évolution bien plus rapide que dans le cas de la toxine diphtérique. Ajoutons, immédiatement : et non accompagnée ou suivie de complications paralytiques.

Nous distinguerons, dans notre description, les effets des doses mortelles et ceux des doses non mortelles.

Doses mortelles. *De 5 cent. cubes à 2 cent. cubes.* — Au bout de la première demi-heure, on observe, *loco læso*, un empâtement rénitent, plus ou moins allongé (du volume moyen d'un œuf de pigeon), avec teinte saumonée des téguments (sur l'étendue de 0 fr. 50 environ). Puis, cette tache, cerclée de vermillon, gagne les parties voisines, en même temps que son aspect se modifie. C'est bientôt une maculature plus foncée (de l'étendue de 2 francs environ), souvent piquetée de violet et toujours limitée par une zone lie de vin. Pendant ce temps, l'empâtement s'est accru lentement, tout en diminuant de consistance. Après cinq-six heures, il est mollasse et recouvert d'un placard ordinairement elliptique (6 centimètres sur 3, environ) à centre dénudé, luisant, humide, de coloration

variée (mélange intime de rouge sombre, de violet et de brun — « tons de charcuterie », si l'on veut bien nous passer la comparaison), à périphérie encore recouverte par l'épiderme et de nuance plus foncée. La mort survient habituellement en dix-quinze heures; lorsqu'elle est un peu moins rapide, la lésion locale a conservé son aspect humide central, mais s'est déjà entourée d'une bordure noirâtre, sèche, comparable à du vernis écaillé.

Entre 2 *cent. cubes et* 0,2 *cent. cube.* — Ici, même après douze-quinze heures, l'empâtement n'excède pas le volume d'une noix. Les lésions tégumentaires sont représentées par une tache (étendue — d'une pièce de 0 fr. 50 à 1 franc) humide et de coloration saumon sale ou lie de vin au centre, brunâtre à la périphérie. Cette tache se transforme, soit partiellement, soit totalement, en « vernis noir », selon la durée de la survie (dix-huit à vingt-quatre heures).

Les *lésions* que l'on observe à l'autopsie *des animaux tués par la toxine Preisz-Nocard* consistent, avant tout : *localement*, dans un œdème sous-cutané d'ordinaire rosé, assez souvent hémorrhagique (gelée de groseille) — *au loin*, dans une congestion très intense et habituellement hémorrhagique des organes abdominaux, surtout de l'estomac (lilas ou « truffé »), du gros intestin (presque toujours lie de vin) et des reins (parfois complètement noirs). Ces altérations, qui ne comportent ni congestion des surrénales ni épanchement intrathoracique, contribuent à différencier totalement la toxine Preisz-Nocard de la toxine diphtérique.

Doses non mortelles (*entre* 0,2 *et* 0,1 *cènt. cube*). — En commençant ce chapitre, nous avons résumé l'évolution des accidents qu'elles déterminent; il suffira donc d'ajouter quelques détails. La première période est caractérisée par un empâtement (allant du volume d'une amande à celui d'une noix), avec humidité et teinte violacée (plus ou moins pure) des téguments. Cette maculature (répondant environ, comme surface, à une pièce de 0 fr. 20) brunit, puis noircit et se transforme en une eschare sèche, brillante, couleur de jais, qui ne tarde point à se soulever sur ses bords et à se détacher de

la périphérie au centre. On aperçoit, alors, l'ulcus sous-jacent, tapissé d'un mince exsudat jaunâtre ; ulcus bientôt détergé. Le bourgeonnement se fait activement, l'infiltration hypodermique, qui avait peu à peu rétrocédé, disparaît et la cicatrisation est vite accomplie.

[Les *doses limites* de toxine ne déterminent qu'un empâtement minime et fugace, avec croûtelles ambrées puis érosions transitoires des téguments.]

Bacille atoxique (Champion).

Nous étudierons, successivement, l'action des germes vivants et l'action des germes tués par l'alcool-éther.

Germes vivants.

La rapide rétrocession de l'infiltrat hypodermique, même après injection de masses considérables, démontre l'*avirulence* complète des bacilles du type Champion (un milliardième de centigramme de l'échantillon Panisset infecte encore le cobaye sous la peau!); jointe à l'absence de lésions tégumentaires et de phénomènes généraux, elle établit péremptoirement leur *atoxicité* (au sens : toxine neutralisable par le sérum spécifique).

Avec 1 centigr., on n'observe pour ainsi dire pas de modifications locales. Avec 5-10 centigr., l'empâtement (seul symptôme réactionnel) oscille entre le volume d'une amande et celui d'une noix; il commence à diminuer, en s'indurant, après quarante-huit heures et, vers le neuvième-dixième jour, on n'en trouve plus de trace. Il faut arriver à 30 centigr. pour obtenir des infiltrations du volume d'un œuf de pigeon; elles n'offrent point une évolution bien longue, mais se compliquent volontiers d'*infections* (*pseudo-pneumocoque* et *pasteurella*), ce que l'on conçoit sans peine, étant donnée la quantité vraiment exagérée de germes administrés.

Les bacilles Preisz-Nocard atoxiques sont donc mieux résorbés que les bacilles diphtériques atoxiques (type Brienne B) ; évidemment, parce que leur substance fondamentale offre une plus grande décoagulabilité. On ne conservera aucun doute à

cet égard après l'étude des injections intraveineuses (*infra*) et même, immédiatement, quand on aura lu ce qui va suivre.

Germes tués par l'alcool-éther.

Les doses de 1-2 centigr. (poids sec, équivalant à 5-10 centigr. de microbes frais) réalisent absolument le type D, dû aux bacilles diphtériques atoxiques (voir notre mémoire précédent), avec sa double terminaison possible, par résolution lente ou par élimination du bourbillon sous-cutané. La coagulation des microbes de Preisz-Nocard ramène donc leur substance fondamentale au niveau de celle des microbes de Löffler.

Bacille toxique (Panisset).

Nous envisagerons encore, successivement, l'action des germes vivants et celle des germes tués par l'alcool-éther; mais en commençant, cette fois-ci, par les derniers, chez lesquels le facteur-virulence n'intervient pas.

Germes tués par l'alcool-éther.

Doses mortelles (*3 à 2 centigr., poids sec = 15 à 10 centigr. de microbes frais*). — La mort survient en douze-vingt-quatre heures; les symptômes et lésions sont sensiblement les mêmes qu'avec la toxine soluble.

Doses non mortelles (*1 centigr. à 0 centigr. 5 = 5 à 2,5 centigr. de microbes frais*). — L'évolution étant ici moins brutale, on ne s'étonnera point de voir apparaître certaines différences réactionnelles, conséquence obligée des différences qui séparent la « toxine liquide » des « microbes alcool-éther ». Ceux-ci apportent, avec eux, un poison coagulé (d'ailleurs intracellulaire) et une substance fondamentale coagulée, elle aussi, mais non négligeable, comme nous l'a montré l'étude du bacille atoxique tué par l'alcool-éther. Il n'en faut pas davantage pour rendre compte des phénomènes observés, que nous allons brièvement résumer (en les commentant encore plus brièvement).

A la première période, l'eschare est moins humide qu'avec

la toxine soluble (libération progressive du poison intracellulaire et coagulé); mais, par contre, l'empâtement s'exagère (effet de la substance fondamentale).

A la période d'eschare sèche, l'empâtement continue à s'étendre et devient même parfois considérable, tout en restant mou; d'où une assez grande prédisposition aux *infections surajoutées*. L'eschare, moins sèche et moins noire qu'avec la toxine soluble (conséquence du fort œdème sous-jacent), peut être comparée, comme consistance et coloration, à du varech séché au soleil.

A la période de réparation, l'empâtement diminue progressivement et s'indure; l'eschare tombe, entraînant la majeure partie d'un bourbillon jaunâtre, dont le reste se retrouve à la surface de l'ulcus qu'elle recouvrait (on notera l'analogie avec le type B, décrit dans notre mémoire sur les bacilles diphtériques); cet ulcus demeure croûteux jusqu'à son entière cicatrisation.

L'évolution n'est pas beaucoup plus longue que dans le cas de la toxine soluble, car tout se termine au bout de quinze jours environ.

[Les doses inférieures à 5 milligrammes déterminent des lésions de plus en plus réduites; finalement (injection d'un décimilligr.) : léger infiltrat hypodermique, croûtelles et simples érosions.]

Germes vivants.

L'injection de germes vivants, à dose régulièrement décroissante, met en évidence un fait des plus curieux. Tant que la quantité de « poison vif » demeure suffisante pour entraîner la mort (rapide), tout se passe, *grosso modo*, comme si on avait injecté du poison soluble. Mais dès que l'on abaisse sensiblement cette quantité, on observe et la survie et une réduction *très notable* des lésions toxiques (c'est-à-dire « toxiniques ») locales — au profit de l'infection, qui se développe graduellement et sûrement. Il existe donc là une *coupure*, dont nous allons indiquer la raison.

Quand on introduit, sous la peau, une masse suffisante de microbes (masse correspondant à la dose mortelle), la toxine contenue dans les indi-

vidus déjà morts (qui représentent certainement la majorité au sein des cultures de plus de vingt-quatre heures) ou dans les individus peu résistants (et vite détruits) provoque un afflux de substances bactéricides qui décoagulent, à leur tour, un certain nombre de germes moins fragiles. Il s'ensuit la libération rapide de nouvelles masses de toxine, un nouvel afflux de substances bactéricides..... et ainsi de suite, jusqu'à ce que la quantité de poison résorbée amène la mort de l'animal.

Au contraire, quand on introduit, sous la peau, une masse insuffisante de microbes (masse inférieure à la dose mortelle), il n'y a plus le *quantum* de toxine immédiatement libre (ou libérable) nécessaire à amorcer des décoagulations étendues. La proportion de germes détruits demeure trop restreinte pour déterminer une lésion locale marquée et aussi, bien entendu, pour enrayer (par afflux de substances bactéricides) la marche de l'infection. Celle-ci se développe donc avec régularité; les microbes continuent à fournir de la toxine, mais isolément et successivement et non plus collectivement et brutalement. La preuve qu'ils continuent à en fournir, bien que « sous un autre régime », c'est qu'ils provoquent des lésions rebelles et que le sérum de chevaux atteints de semblables lésions (nous n'avons pas étudié celui des cobayes, mais tout démontre qu'il se comporterait comme celui des chevaux) manifeste, ainsi qu'on le verra, un pouvoir antitoxique très accentué.

Ceci posé, mentionnons que le bacille Panisset tue, à 1 centigr., en vingt-quatre heures; si l'on force les doses, on peut produire la mort en douze heures; si on les diminue, en un jour et demi à deux jours. La *coupure* se manifeste aux environs de 1 milligr.

[Les différents germes vivants, étudiés par nous au point de vue de leur toxicité, se sont montrés très inégalement actifs. Certains pouvaient supporter la comparaison avec le Panisset, d'autres lui demeuraient inférieurs, voire très inférieurs. — Nous avons omis de dire qu'il en va de même pour ces divers germes, tués par l'alcool-éther.]

Doses mortelles (0,1 *centigr. à* 10 *centigr. et plus*). — On n'observe pas, pratiquement, de différences sensibles entre les effets de la toxine soluble et ceux des microbes vivants, lorsqu'on injecte un excès notable de ceux-ci; mais, à mesure qu'on descend vers la dose mortelle minima, les lésions locales se montrent (ainsi qu'il fallait s'y attendre) intermédiaires à celles que détermine le poison soluble et à celles que provoquent les microbes alcool-éther (doses subléthales).

Doses non mortelles. — L'intoxication tégumentaire se traduit uniquement ici par une petite tache violacée, dont le développement reste progressif et qui se transforme en une

eschare noirâtre. Celle-ci tombe et découvre un ulcus peu étendu, à fond jaune et sec. Au contraire, l'empâtement augmente régulièrement depuis le début et peut devenir considérable.

Il est rare que l'ulcus évolue franchement vers la cicatrisation. On voit, dans la règle, le fond se remplir de pus (riche en bacilles Preisz-Nocard) et les bords se tuméfier et prendre une teinte rose, animée. Souvent, ces bords, festonnés, représentent une couronne de petits nodules infectieux; d'autres nodules, satellites, apparaissent habituellement autour de l'ulcus; et tous forment bientôt autant de petits abcès, remplis de germes spécifiques. La réaction ganglionnaire ne tarde point à se manifester (tuméfaction des glandes inguinales, avec ou sans corde lymphangitique) et l'on se trouve en présence de l'infection type, dont la description sortirait entièrement de notre sujet.

Action du sérum Carré sur la toxine et les bacilles.

[Mentionnons, pour n'y plus revenir, que *le sérum Carré ne manifeste aucun pouvoir antivirulent*; 1 cent. cube se montre, en effet, totalement incapable de neutraliser par mélange (une demi-heure de contact — température ordinaire) 0,01 centigr. de l'échantillon Panisset.]

Nous avons fait agir le sérum Carré sur la toxine, les bacilles atoxiques et les bacilles toxiques, simultanément (à distance), par mélange et préventivement.

Sérum a distance
(dans les muscles gastrocnémiens).

Action sur la toxine. — 2 cent. cubes de sérum empêchent la mort par 2 cent. cubes de toxine, mais les animaux offrent une petite eschare locale. Il suffit d'abaisser quelque peu la dose de poison, pour que la nécrose fasse défaut. Comme dans le cas de la toxine diphtérique, le sérum apparaît moins actif vis-à-vis du *facteur-escharification* que vis-à-vis du *facteur-intoxication générale*.

Action sur les bacilles atoxiques (b. vivants ou b. alcool-éther). — Elle demeure *absolument nulle*.

Action sur les bacilles toxiques. — *B. alcool-éther.* 2 cent. cubes de sérum empêchent la mort par 2 centigr. de microbes alcool-éther (= 10 centigr. de microbes frais), mais les cobayes présentent, habituellement, une légère mortification des téguments. — *B. vivants.* 2 cent. cubes de sérum empêchent la *mort* (rapide) *par intoxication*, quand on injecte 2 centigr. de germes vivants et l'eschare locale reste minime; bien entendu, l'*infection ultérieure* n'est nullement influencée. Tout se passe comme si l'on avait administré une dose non mortelle (1 milligr. et moins); le sérum opère, ici, la *coupure* dont nous avons parlé plus haut. — Au regard des bacilles toxiques, ainsi qu'au regard du poison soluble, le sérum se montre donc moins actif sur la lésion locale que sur l'empoisonnement de l'organisme.

Sérum par mélange

(une demi-heure de contact).

Action sur la toxine. — 2 cent. cubes de sérum neutralisent complètement 2 cent. cubes de toxine. — Le *chauffage* du poison détermine les mêmes effets que le sérum.

Action sur les bacilles atoxiques (b. vivants ou b. alcool-éther). — Le sérum, mélangé à ces microbes, exagère volontiers l'empâtement réactionnel, surtout au début; d'où une certaine fréquence des infections secondaires.

Action sur les bacilles toxiques. — *B. alcool-éther.* 1 cent. cube de sérum neutralise complètement 2 centigr. de microbes alcool-éther. — *B. vivants.* 2 cent. cubes de sérum empêchent et la mort (rapide) et l'eschare locale, quand on les ajoute à 2 centigr. de germes vivants; mais ils ne sauraient conjurer, naturellement, l'infection subséquente. Le mélange du sérum aux bacilles toxiques (b. vivants ou b. alcool-éther) favorise, dans un certain nombre de cas, l'apparition d'infections surajoutées, en exagérant l'œdème initial. — Le *chauffage* des microbes toxiques les rend totalement inoffensifs, comme fait le sérum.

Il n'est pas étonnant que le sérum, administré par mélange, se révèle plus actif que le sérum injecté au loin. — Quant à la *méthode préventive*, dont nous allons parler, elle tient le milieu

entre les deux autres. Nous ne l'avons point employée dans nos recherches sur les bacilles de Löffler, parce que l'action de la toxine diphtérique, toujours lente, se trouve aisément entravée par l'administration simultanée du sérum — elle s'imposait, au contraire, ici puisque nous avons affaire à un poison très rapide dans ses effets et que l'antitoxine, injectée au loin, ne « rattrappe » généralement pas assez tôt. La méthode préventive offre donc, sur la méthode simultanée, l'avantage d'une efficacité plus grande ; elle offre, sur les mélanges, l'avantage d'éviter toute infection secondaire (liée à l'exagération de l'empâtement local) : d'où son usage exclusif dans le *toxino-diagnostic* (voir plus loin).

Sérum préventif

(la veille, dans les muscles gastrocnémiens).

Action sur la toxine. — 1 cent. cube de sérum empêche la mort par 2 cent. cubes de poison, mais les animaux offrent une petite eschare locale. Celle-ci cesse d'ailleurs de se manifester dès qu'on diminue légèrement la dose toxique.

Action sur les bacilles atoxiques (b. vivants ou b. alcool-éther). — *Nulle.*

Action sur les bacilles toxiques. — *B. alcool-éther.* 2 cent. cubes de sérum neutralisent complètement les effets de 2 centigr. de microbes alcool-éther. — *B. vivants.* 2 cent. cubes de sérum empêchent la mort (rapide) et l'eschare locale, quand on injecte 2 centigr. de germes vivants ; sans influer, bien entendu, sur l'infection ultérieure.

[*Le sérum équin normal* et le *sérum antidiphtérique* ne manifestent *jamais* la moindre action sur la toxine, les bacilles atoxiques ou les bacilles toxiques.]

L'étude des injections sous-cutanées du poison et des bacilles (toxiques ou non) soit seuls, soit combinés avec le sérum (administré préventivement, par mélange ou à distance), *répond déjà*, dans une large mesure, *aux deux questions posées en débutant.*

L'identité de la *toxine* des microbes et de celle des filtrats

ne saurait être contestée, car le sérum Carré neutralise pareillement l'une et l'autre. Quant à la *substance fondamentale*, nous connaissons maintenant ses effets locaux (empâtement sous-cutané), que le sérum exagère volontiers quand on emploie la méthode des mélanges.

La toxine Preisz-Nocard diffère profondément de la toxine diphtérique par la rapidité de son action, par la nature des lésions qu'elle détermine (sur place et au loin) et par l'absence de paralysies tardives. Elle n'est pas plus justiciable du sérum antidiphtérique que le poison des bacilles de Löffler ne l'est du sérum Carré. La substance fondamentale des microbes Preisz-Nocard diffère de celle des bacilles diphtériques par sa plus grande décoagulabilité; aussi n'engendre-t-elle de bourbillon sous-cutané que si on la ramène au niveau de la substance fondamentale des microbes de Löffler, en la coagulant par l'alcool-éther.

Action du sérum des chevaux chroniquement infectés sur la toxine et les bacilles.

L'un de nous (Forgeot), possédant au lazaret de l'École Militaire deux chevaux atteints de lymphangite de Nocard, a proposé de comparer le sérum de ces animaux avec le sérum Carré. L'*identité* était *complète* : absence de pouvoir antivirulent, présence d'un pouvoir antitoxique très marqué. Nous avons alors prié M. Cesari de recueillir *tous* les sérums de chevaux sacrifiés à l'abattoir Brancion et porteurs de lymphangite ou d'abcès rénaux, d'origine Preisz-Nocard. Voici comment les expériences ont été combinées. M. Cesari nous envoyait à la fois deux tubes étiquetés A et B, *sans rien spécifier*. Tantôt il s'agissait de deux sérums équins normaux, tantôt de deux sérums Preisz-Nocard, tantôt d'un sérum normal et d'un sérum Preisz-Nocard. Nous injections 2 cent. cubes de chaque sérum dans les muscles des cobayes et, le lendemain, 2 centigr. de bacilles toxiques alcool-éther sous la peau de ces animaux et d'un témoin. Les témoins et les « sujets sérum normal » ont *toujours* succombé très rapidement; les « sujets Preisz-Nocard » ont *toujours* résisté, sans lésion locale ou avec une eschare minime. M. Cesari isolait, de son côté, les bacilles Preisz-

Nocard à l'autopsie des sujets dont il nous avait envoyé le sérum, et ces germes étaient rigoureusement identifiés.

Nous sommes donc en présence d'une *propriété antitoxique* qui paraît constante chez les chevaux chroniquement atteints et grâce à laquelle le diagnostic des lésions latentes (abcès rénaux) pourra être aisément réalisé *intra vitam*. Il serait intéressant d'étudier, au même point de vue, le sérum des cobayes inoculés et, avant tout, celui des moutons atteints de l'infection naturelle.

Inutile d'insister sur l'*importance théorique et pratique des faits qui précèdent*. Ils établissent l'existence inattendue d'un pouvoir antitoxique notable au cours d'une affection microbienne chronique ; ils conduisent, corrélativement, à une méthode de diagnostic non moins inattendue, le *toxino-diagnostic* (ou antitoxino-diagnostic, si l'on préfère), dont les applications pourraient bien dépasser l'histoire des maladies Preisz-Nocard.

[Mentionnons, en terminant, que le sérum des chevaux chroniquement infectés se montre parfois plus actif que le sérum Carré, soit sur le poison soluble, soit sur les bacilles toxiques.]

ÉTUDE DES INJECTIONS INTRAVEINEUSES

Toxine soluble.

Pour tuer sûrement les animaux, il faut atteindre le volume de 1 cent. cube. Au-dessous (jusqu'à 0,1 cent. cube), on détermine une émaciation transitoire, parfois assez marquée mais sans accidents consécutifs. Le passage de la dose mortelle à la dose pratiquement inoffensive se fait donc assez brusquement.

1 cent. cube amène la mort en vingt-quatre-trente-six heures (altération progressive de l'état général) ; 2 cent. cubes, dans la nuit (apathie, troubles respiratoires, sensibilité et ballonnement du ventre) ; 3-4 cent. cubes, en quelques heures (coma à marche rapide, accompagné de phénomènes abdominaux et de dyspnée croissante) ; 5 cent. cubes, en une heure et moins (embarras respiratoire et convulsions). Quand la terminaison n'est pas trop précoce, les lésions viscérales restent les mêmes

que lors de l'injection sous-cutanée; autrement, tout se borne à une congestion banale des organes de l'abdomen.

Qu'on l'introduise par la voie intraveineuse ou par la voie hypodermique, la toxine Preisz-Nocard apparaît donc toujours radicalement différente, quant à ses effets, de la toxine diphtérique.

Bacille atoxique (Champion).

Germes vivants. — Les cobayes en supportent jusqu'à 10 centigr. sans aucun accident immédiat ni tardif (on note, éventuellement, une légère émaciation transitoire). Avec 15 centigr., apparaît le *type mortel lent*, décrit dans notre précédent mémoire; avec 25 centigr., le *type rapide*. Les bacilles Preisz-Nocard atoxiques font périr les animaux sous une masse plus faible que les bacilles diphtériques atoxiques, ce qui tient à la plus grande décoagulabilité de leur substance fondamentale, particularité déjà observée lors des injections sous-cutanées. Voilà donc un caractère différentiel simple, nouveau et assez inattendu, qui permettra de reconnaître aisément les types atoxiques du groupe Preisz-Nocard et du groupe Löffler.

Germes tués par l'alcool-éther. — 15 centigr. de bacilles frais, traités par l'alcool-éther puis desséchés, fournissent 3 centigr. d'une poudre dont l'émulsion ne produit aucun effet nuisible quand on l'injecte dans les veines. Cette disparition de la toxicité était certaine d'avance, puisque l'alcool-éther coagule la substance fondamentale des germes en jeu.

Bacille toxique (Panisset).

Germes vivants. — Pour tuer par empoisonnement (rapide), il faut atteindre 1 centigr.; au-dessous, les sujets n'offrent jamais de symptômes toxiques (ils s'infectent d'ailleurs, sans exception, même avec 0 centigr. 001). Nous retrouvons, encore plus schématique, la *coupure* dont il a été parlé lors des injections hypodermiques, ce qui nous permettra d'établir les deux divisions suivantes.

Intoxication. — 1-2 centigr. amènent la mort dans la nuit; 5 centigr., en quelques heures; 10 centigr., en une heure et moins. Ces effets sont dus à la seule toxine, puisque 10 centigr. de substance fondamentale n'offrent, pratiquement, aucune

nocuité. Au-dessus de 10 centigr., par contre, cette substance entre en jeu et l'on comprend facilement que les cobayes puissent succomber très vite.

[Parmi nos échantillons de bacilles toxiques, certains se sont montrés aussi actifs que le Panisset ; les autres s'en éloignaient plus ou moins, parfois beaucoup.]

Infection. — La mort survient après cinq-dix jours (pour des doses de 0 centigr. 01 à 0 centigr. 001). Voici, *en deux mots*, ce que l'on observe. Tout d'abord, rien d'anormal, sinon une baisse de poids progressive. Vers le 3[e] jour seulement, apparaît l'éruption caractéristique, sur les bords de la plaie opératoire (région cervicale), puis dans ses environs immédiats. Les pustules éclosent, ensuite, au niveau du scrotum, des oreilles, du nez, des lèvres, de la conjonctive..., où elles deviennent de plus en plus abondantes et volumineuses. Quand la survie le permet, se manifestent du gonflement des mains et des pieds, de la kératite (souvent suivie de fonte suraiguë de l'œil) et de vrais abcès cutanéo-sous-cutanés (scrotum, oreilles, nez...). A l'autopsie : granulomes du foie, de la rate, des poumons, du *musculus testis* et du corps adipeux, de l'albuginée (testicule et épididyme), du péritoine pariétal.... et, lorsque la mort n'est pas trop rapide : gros nodules caséo-purulents du *musculus testis*, de l'albuginée...

Germes tués par l'alcool-éther. — Mentionnons simplement quelques chiffres : 0 centigr. 5 (= 2 centigr. 5 de microbes frais) tuent en vingt-quatre heures ; 1-2 centigr. (= 5-10), dans la nuit ; 3 centigr. (= 15), en six-douze heures.

Mêmes symptômes et lésions qu'avec la toxine soluble et les bacilles vivants ; différences d'activité, parfois très notables, entre le Panisset pris comme type et les autres échantillons étudiés.

Action du sérum carré sur la toxine et les bacilles.

L'injection de sérum simultanément et à distance était encore plus contre-indiquée ici que dans nos études sur les bacilles diphtériques, en raison de l'action particulièrement rapide de la toxine Preisz-Nocard ; aussi l'avons-nous laissée volontairement de côté.]

Toxine soluble. — *Préventivement.* 2 cent. cubes de sérum empêchent la mort par 1 cent. cube de toxine. — *Par mélange.* 1 cent. cube neutralise aisément 1 cent. cube de poison.

Bacilles atoxiques. — [*Préventivement et par mélange.*] *Action nulle* sur les microbes vivants et les microbes alcool-éther. *Nous ne retrouvons* donc *pas*, même avec les germes vivants, *l'hypersensibilité passive* observée lors de nos recherches sur les bacilles de Löffler. A quoi attribuer cette différence? Certainement, à l'absence d'un pouvoir albuminolytique suffisant du sérum Carré; certainement, aussi, à la nature des microbes étudiés. La grande décoagulabilité des bacilles Preisz-Nocard les rend mortels pour des doses plus faibles que celles employées dans nos expériences sur les bacilles diphtériques. D'où moins de latitude dans la recherche de l'hypersensibilité. Moins de latitude, encore, avec les *bacilles toxiques*, chez lesquels le poison spécifique tue déjà rapidement par lui-même quand on arrive à 10 centigr. [Nous verrons bientôt que l'*hypersensibilité active* peut être obtenue sous certaines conditions.]

Bacilles toxiques. — *B. vivants.* 5 cent. cubes de sérum *préventivement* et 2 cent. cubes *par mélange* empêchent la mort rapide, quand on injecte 5 centigr. de germes vivants; bien entendu, l'infection ultérieure survient fatalement. — *B. alcool-éther.* 3 cent. cubes de sérum *préventivement* et 2 cent. cubes *par mélange* neutralisent l'effet de 2 centigr.

[Mentionnons l'inefficacité absolue du *sérum antidiphtérique* et du *sérum équin normal* et indiquons que le *sérum des chevaux chroniquement infectés* se montre souvent au moins aussi actif que le sérum Carré.]

Pour démontrer l'existence de l'*hypersensibilité active*, nous avons traité, parallèlement, deux séries de cobayes par des injections répétées de germes Panisset et Champion, chauffés une demi-heure à 55 degrés (on injectait, chaque fois, 5 centigr. de microbes dans les muscles) — puis, nous avons éprouvé ces animaux dans les veines, suivant le mode direct ou croisé, avec 10-15 centigr. de microbes homologues ou hétérologues, également chauffés une demi-heure à 55 degrés. Tandis que les témoins ont toujours parfaitement résisté à l'administration des bacilles ainsi modifiés, les sujets traités périssaient rapidement, en présentant les phénomènes habituels, suffisamment décrits dans notre travail antérieur pour qu'il soit inutile d'y revenir ici.

Justifions les conditions expérimentales choisies par nous. *Pour la préparation* des « cobayes Panisset », il était indispensable d'éliminer le facteur-virulence ; d'où le chauffage des germes (lequel éliminait, en même temps, le facteur-toxicité) ; ce chauffage s'imposait donc, *ipso facto*, dans le traitement des « cobayes-Champion ». *Pour l'épreuve*, il valait mieux, *théoriquement*, employer les antigènes qui avaient servi à la préparation des animaux; *pratiquement* aussi, car ils donnent plus de marge que les microbes vivants.

Ceci posé, nous ne devons point dissimuler que les bacilles Preisz-Nocard, comme l'établissent des expériences répétées entreprises sur le sujet — expériences dont le détail n'offrirait aucun intérêt — hypersensibilisent moins facilement les cobayes que ne font les bacilles de Löffler. Nouveau caractère différentiel entre ces deux groupes de microorganismes.

L'étude des injections intraveineuses confirme donc l'identité de la toxine des microbes et de celle des filtrats. Elle complète, d'autre part, l'histoire de la substance fondamentale, en prouvant que celle-ci peut déterminer la mort quand elle pénètre, à dose suffisante, dans le système sanguin.

Ici encore et d'une manière plus frappante, la toxine Preisz-Nocard se montre tout à fait différente de la toxine diphtérique par la rapidité de son action, la nature des lésions qu'elle engendre et l'absence de complications tardives — ici encore, la substance fondamentale apparaît différente de celle des bacilles de Löffler par sa plus grande décoagulabilité, que le traitement à l'alcool-éther permet de faire rétrocéder.

CONCLUSIONS

Parmi les *facteurs de toxicité des bacilles Preisz-Nocard*, l'un, *constant*, est représenté par la *substance fondamentale* ; l'autre, *inconstant*, par la *toxine soluble.*

La substance fondamentale ne détermine qu'un simple empâtement local quand on l'introduit sous la peau, mais elle peut tuer aisément les animaux lorsqu'on emploie la voie intraveineuse. La toxine soluble se caractérise, avant tout, par la rapidité et l'intensité de ses effets, quel que soit le mode d'administration choisi; le sérum spécifique (sérum Carré) et *celui des chevaux atteints d'affections chroniques à microbes de Preisz-Nocard* la neutralisent sans difficulté (tandis qu'ils demeurent inactifs sur le facteur-virulence).

Toxine soluble et substance fondamentale diffèrent absolument de celles des bacilles diphtériques.

NOUVEAU PROCÉDÉ DE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A BACILLES DE PREISZ-NOCARD

par P. FORGEOT et E. CESARI

Dans le travail qui précède, l'un de nous a fait connaître, avec M. Nicolle et G. Loiseau, l'action inattendue du sérum des chevaux chroniquement infectés sur la toxine des bacilles de Preisz-Nocard et indiqué de quelle manière, à la fois simple et sûre, il était possible de démontrer cette action.

Il nous a paru intéressant de rapporter brièvement les documents qui ont servi à établir l'existence de cette curieuse propriété des sérums. Ce sont : d'une part, les observations (très résumées) de deux juments étudiées à l'École Militaire, observations dues à l'obligeance de notre camarade M. le vétérinaire en second Larieux; d'autre part, les protocoles d'expériences faites avec le sérum de onze chevaux de l'abattoir Brancion.

Le sérum des juments de l'École Militaire a été étudié *en connaissance de cause*, c'est-à-dire après établissement du diagnostic clinique et bactériologique. Pour le sérum des chevaux de l'abattoir Brancion, au contraire, celui qui procédait à l'examen ignorait le diagnostic clinique (ou anatomo-pathologique) et bactériologique, ainsi qu'il a été mentionné dans le travail ci-dessus. Il recevait tantôt des sérums normaux, tantôt des « sérums Preisz-Nocard », tantôt les deux, sans indication aucune d'origine. Dans les protocoles qui suivent, les sérums normaux figurent comme témoins et non comme « pièges », pour la clarté de l'exposition.

Rappelons, en quelques mots, la *technique* employée. Le sérum à examiner est injecté, à la dose de 2 centimètres cubes, dans les muscles gastrocnémiens d'un cobaye (animal de 500-600 grammes). Le lendemain, ce cobaye, ainsi qu'un témoin, reçoit, par la voie sous-cutanée, 2 centigrammes de bacilles Preisz-Nocard toxiques, tués par l'alcool-éther (et desséchés dans le vide sulfurique). Le témoin succombe toujours très rapidement, tandis que le sujet « sérum Preisz-Nocard » résiste toujours, sans lésion locale ou avec une eschare minime. Un cobaye « sérum équin normal » se comporte constamment comme un témoin. — Le sérum à examiner peut être injecté, si l'on

veut, à deux animaux, comme nous l'avons fait assez souvent au début, mais il nous semble maintenant inutile d'employer plus d'un cobaye (c'est-à-dire deux, avec le témoin).

Animaux de l'École Militaire.

Ces deux juments ont pu être observées au lazaret, grâce à l'intervention de M. le vétérinaire principal Sandrin, qui les y avait fait venir et que nous sommes heureux de remercier ici.

Jument *Cocotte*, huit ans. — Entrée à deux reprises à l'infirmerie, en 1907, pour lymphangite du membre postérieur gauche. Passée aux indisponibles, à deux reprises, en 1907 ; à deux reprises, en 1908 ; une fois, en 1910. Réformée en 1911. Le diagnostic bactériologique et le prélèvement du sérum ont été faits en novembre 1910.

Le sérum a servi à de *très nombreuses expériences* ; en voici deux, prises au hasard (avec témoins).

Cobaye I. (Sérum *Cocotte*). Eschare minime.

Cobaye II. (Sérum *Cocotte*). Même résultat.

Cobaye III. (Sérum équin normal). Eschare étendue, mort en moins de vingt-quatre heures. Congestion des viscères abdominaux

Cobaye IV. (Sérum équin normal). Eschare étendue, mort en un jour. Congestion des viscères abdominaux.

Cobaye V. (Pas de sérum). Même résultat que pour le cobaye IV.

Jument *Déconsidération*, sept ans. — Entrée aux indisponibles, deux fois, en 1910, pour traumatisme du membre postérieur droit ; entrée ensuite à l'infirmerie, la même année, pour lymphangite de ce membre. Réformée en 1911. Examen bactériologique et prélèvement du sérum en novembre 1910. *Expériences très nombreuses*, ici encore, avec le sérum. En voici deux, entre autres.

Cobaye I. (Sérum *Déconsidération*). Eschare minime.

Cobaye II. (Sérum *Déconsidération*). Œdème transitoire.

Cobaye III. (Sérum équin normal). Eschare étendue, mort en vingt-quatre heures. Congestion des viscères abdominaux.

Cobaye IV. (Sérum équin normal). Même résultat que pour le cobaye III.

Cobaye V. (Pas de sérum). Encore le même résultat.

Animaux de l'abattoir Brancion.

[Le diagnostic bactériologique a toujours été pratiqué concurremment avec l'étude des sérums.]

Cheval A. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum A). Œdème transitoire.

Cobaye II. (Sérum A). Même résultat que pour le cobaye I.

Cobaye III. (Pas de sérum). Eschare étendue, mort en un jour et demi. Congestion gastrique.

Cheval B. (Lymphangite).

Cobaye I. (Sérum B). Eschare minime.
Cobaye II. (Sérum B). Eschare peu étendue.
Cobaye III. (Sérum équin normal). Eschare étendue, mort en deux jours et demi. Congestion du gros intestin.
Cobaye IV. (Sérum équin normal). Eschare moyenne, mort en un jour. Congestion des viscères abdominaux. Congestion hémorrhagique de l'estomac.
Cobaye V. (Pas de sérum). Eschare étendue, mort en trois jours. Congestion des viscères abdominaux.

Cheval C. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum C). Eschare minime.
Cobaye II. (Sérum C). Œdème transitoire.
Cobaye III. (Pas de sérum). Eschare peu étendue, mort en un jour. Congestion gastrique.

Cheval D. (Lymphangite).

Cobaye I. (Sérum D). Œdème transitoire.
Cobaye II. (Sérum D). Eschare minime.
Cobaye III. (Pas de sérum). Eschare peu étendue, mort en moins de vingt-quatre heures. Congestion violente et hémorrhagique de l'estomac; congestion des viscères.

Cheval E. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum E). Eschare minime.
Cobaye II. (Pas de sérum). Eschare moyenne, mort en un jour et demi. Congestion des viscères abdominaux.

Chevaux F et G. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum F). Œdème transitoire.
Cobaye II. (Sérum G). Eschare minime.
Cobaye III. (Sérum équin normal). Eschare étendue, mort en un jour. Congestion des viscères abdominaux.
Cobaye IV. (Pas de sérum). Eschare étendue, mort dans la nuit. Congestion violente des viscères ; congestion hémorrhagique de l'estomac.

Cheval H. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum H). Œdème transitoire.
Cobaye II. (Pas de sérum). Eschare étendue, mort en moins de vingt-quatre heures. Congestion hémorrhagique de l'estomac.

Cheval I. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum I). Eschare minime.
Cobaye II. (Sérum équin normal). Eschare moyenne, mort en un jour et demi. Congestion violente de l'intestin et de l'estomac.
Cobaye III. (Pas de sérum). Eschare étendue, mort en un jour. Congestion de l'estomac.

Chevaux J et K. (Abcès du rein).

Cobaye I. (Sérum J). Escharre minime.
Cobaye II. (Sérum K). Œdème transitoire.
Cobaye III. (Pas de sérum). Escharre étendue, mort en un jour et demi. Congestion violente de l'estomac.

Il résulte de ce qui précède que *le sérum de treize chevaux*, atteints d'infections chroniques à bacilles de Preisz-Nocard et *pris au hasard s'est montré* suffisamment *antitoxique* pour conjurer la mort des cobayes traités par le poison homologue, administré sous la forme de microbes alcool-éther (uniquement parce que c'est la plus pratique) et pour réduire à zéro, ou à peu de chose, la lésion locale. Sur ces treize chevaux, neuf n'étaient porteurs que de lésions latentes (abcès rénaux), *insoupçonnables par les moyens d'investigation dont nous disposions jusqu'ici*. Ce seul fait démontre et la nouveauté et l'importance du toxino-diagnostic. Il invite également à des recherches ultérieures, susceptibles de faire connaître : le moment où s'établit la propriété antitoxique du sérum, l'évolution de cette propriété et ses rapports quantitatifs avec l'âge et l'intensité de l'infection.

EXPÉRIENCES SUR LA VIE SANS MICROBES

par Michel COHENDY

(Travail du laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.)

INTRODUCTION

La vie sans microbes est-elle possible?

Pasteur (1) dit à ce sujet : « Il y aurait grand intérêt à tenter l'expérience. L'œuf de la poule (s'y) prêterait sans difficulté sérieuse... » etc...

Ainsi furent posées les bases de l'étude d'une question si intimement liée à l'œuvre qu'il venait de créer, la physiologie des microbes.

Pour Metchnikoff, élucider ce problème biologique, c'était s'éclairer du même coup sur le rôle tenu envers nous par les microbes de notre tube digestif, microbes avec lesquels nous vivons en communauté constante.

Il voulut savoir tout d'abord s'il existait dans la nature des êtres vivants ne portant normalement « en eux » aucune bactérie. Ses recherches lui révélèrent l'asepsie totale de l'intestin du scorpion et des larves de plusieurs espèces de mites (*Galleria*, *Tinea*, etc.) (2). Portier (3), depuis lors, observa que parmi les chenilles de microlépidoptères, celles de *Lithocolletis*, du *Nepticulus* du rosier sont toujours aseptiques. Parmi les helminthes, parasites de l'homme, nous avons trouvé quelques lombrics jeunes vides de microbes; d'autres, adultes, provenant soit de l'homme, soit du chien, bien que très pauvres en bactéries, en contenaient cependant de deux à quatre espèces.

(1) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1885, t. C, p. 66.

(2) Les microbes intestinaux (revue). *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. I, n°7, p. 268.

(3) *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1905, I, avril, p. 605.

Weinberg et M[lle] Inga Sœves (1) n'ont rencontré qu'exceptionnellement des microbes — encore étaient-ils isolés — dans les coupes du tricocéphale, de l'oxyure et de l'enkylostome de l'homme et du chimpanzé. De plus, Weinberg nous a communiqué que l'intestin de certains lézards en hibernation, observés en Tunisie par M. Romanovitch et lui, ne contenait que très peu ou pas de bactéries.

Chez l'homme, qui devait nous servir de terme de comparaison, nous avons compté 143.870.000 bactéries, d'espèces très variées, pour 1 milligramme de fèces (2); chez le chien, nous en avons trouvé un nombre presque égal, nombre environ quatre fois plus faible chez les grands fauves en ménagerie ainsi que chez le sanglier, mille fois moindre chez les oiseaux coureurs (casoar, tinamou); ce nombre est réduit à quelques milliers chez les oiseaux de proie (condor, aigle, faucon) et chez le corbeau, à une centaine chez le perroquet adulte (*Chryzotis amazonica*), — une des espèces microbiennes isolées de cet animal digérait la cellulose, — à quelques unités chez un jeune perroquet de la même variété. Tout aussi rares sont les bactéries dans le tube digestif du caïman.

Nous venons de voir que dans la nature le développement de certains invertébrés se passe du concours des bactéries; il ne paraît pas qu'il en soit de même chez les vertébrés. S'il est vraisemblable que la richesse de la flore intestinale soit la même depuis l'origine de l'espèce animale, on admettra aisément que la coexistence de l'individu et de sa flore ait établi entre eux une adaptation mutuelle parfaite sans laquelle la vie deviendrait impossible. C'est l'opinion de Ribbert (3); elle est comme celle de Pasteur (4), basée sur des conceptions théoriques.

Qu'en dit l'expérience?

Maintes fois des recherches furent « tentées », mais non « sans difficulté sérieuse ».

Nous avouons pour notre part qu'elles nous ont demandé

(1) *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1906, t. LXI, Déc., p. 560.
(2) *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1906, t. LX, p. 415.
(3) *Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abtheilung*, Supp.: 1908, p. 173.
(4) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1885, t. C.

plus de trois années de patience et que nous nous sommes souvent heurté à des obstacles déconcertants.

Sur les invertébrés, deux essais d'élevage stérile ont été faits.

Bogdanow (1), après avoir désinfecté des œufs de mouche, les introduit dans des récipients contenant de la viande stérile; une fois, par exception, les larves stériles ainsi obtenues, s'étaient aussi bien développées que les larves normales, contaminées. Il conclut de l'ensemble de son travail que pour se développer ces larves ont besoin de microbes. Wollman (2), dont nous avons pu apprécier la parfaite technique expérimentale, a fait, à son tour, vivre stérilement des larves de mouche (*Lucilia Cesar* et *Caliphora vomitoria*). Il observe « que pendant les premiers jours de la vie, ses larves stériles se développent plus lentement que les témoins contaminés; plus tard les larves stériles atteignent le poids et la taille des larves adultes normales ». Il arrive finalement à des conclusions différentes de celles de Bogdanow et attribue les résultats défavorables obtenus par ce dernier à la stérilisation des milieux d'élevage faite à une température trop élevée.

On le voit, ces derniers faits expérimentaux concordent avec ceux observés dans la nature. Ils permettent de conclure nettement que certains invertébrés peuvent arriver à un développement normal sans le concours des microbes.

Le problème n'est pas résolu pour les vertébrés.

Schottelius (3) a consacré plusieurs années à l'étude de cette question. Pour ses expériences, il a pris l'œuf de poule. Son installation comporte un grand laboratoire possédant une chambre de verre de 6 mètres cubes, à double porte, dans laquelle sont disposés les petits appareils d'élevage. Ceux-ci sont des caisses métalliques d'environ 10 décimètres cubes placées sur un réservoir à température constante réglable de l'extérieur, ouvertes sur une de leurs faces verticales. Devant cette ouverture est disposée une glace de verre, mobile, occupant environ les deux tiers inférieurs. Le tout est stérilisé d'abord par les vapeurs d'aldéhyde formique, celles-ci sont

(1) *Der Todaus Alterschwäche*. Bonn, 1908, p. 33.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, Janvier 1911, t. I, p. 79.
(3) *Archiv für Hygiene*, 1899, t. XXXIV; 1902, t. XLII; 1908, t. LXVII.

saturées par l'ammoniaque, ensuite on fait une deuxième stérilisation en brûlant du soufre précipité. L'opérateur, pourvu d'un vêtement en toile aseptisée laissant libre seulement le haut du visage, muni de gants et de chaussures en caoutchouc stérilisés, pénètre dans la chambre de verre le premier jour de l'expérience et dispose dans les petits appareils d'abord les aliments (millet et blanc d'œuf) et l'eau de boisson stérilisés par la chaleur, puis les œufs prêts à éclore, désinfectés. L'éclosion ayant eu lieu, portes et interstices du laboratoire et de la chambre de verre restent soigneusement clos pendant les premiers jours de l'expérience; vers le 10e jour, et suivant les besoins de l'expérience, on pénètre de nouveau dans le laboratoire et la chambre de verre avec les mêmes précautions que la première fois. L'expérience terminée, le contrôle est fait par des ensemencements en gélatine.

Nous avons pu suivre ces expériences dans tous leurs détails pendant un séjour de plusieurs mois fait au laboratoire du professeur Schottelius. Souvent répétées par lui, elles l'ont conduit à formuler cette opinion que la vie est impossible sans les microbes.

Mme Metchnikoff (1) a pensé que, parmi les vertébrés, les larves de Batraciens réunissaient les meilleures conditions pour l'élevage à l'abri des bactéries. Avec une grande habileté de technique, elle réussit à faire se développer stérilement toute une série de têtards de grenouille rousse. Mais ces têtards sont chétifs, « mal venus ». Dans la suite, Mme Metchnikoff fait de nouvelles tentatives en variant les aliments; c'est en vain. Ses têtards, comme les poussins de Schottelius, sont moins développés que les témoins contaminés; ils deviennent cachectiques.

Il en est de même des têtards élevés par Moro (2).

Nuttall et Thierfelder (3) tentèrent l'élevage stérile de petits cobayes retirés par l'opération césarienne de l'utérus maternel. Ces petits animaux ont paru augmenter de poids normalement, mais de très grandes difficultés techniques obligèrent ces savants à interrompre leurs expériences le 10e jour; ce qui fit dire à Schottelius que l'augmentation de poids des cobayes

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1901, p. 603.
(2) *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 1905, t. II, p. 467.
(3) *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1895, t. XXI, p. 109.

était fictive et due en réalité au lait ingéré; ce lait coagulé, mais non digéré, ayant été retrouvé à l'autopsie accumulé dans le gros intestin.

L'hypothèse, émise par Pasteur, concernant vraisemblablement les vertébrés seuls, paraît donc confirmée par les expériences que nous venons de citer. Cependant le fait contradictoire présenté par Nuttall et Thierfelder, bien qu'insuffisamment établi, ainsi que la pauvreté microbienne de certains organismes tels que celui du perroquet, du caïman, firent penser à Metchnikoff que le problème était loin d'être résolu ; c'est alors qu'il nous pria d'apporter notre contribution à ces études expérimentales de la vie aseptique chez les vertébrés.

Nous avons choisi, comme Schottelius, l'œuf de la poule *légué* par Pasteur.

Nos expériences correspondent à deux périodes distinctes. Celles de la 1re période, succinctes, sont des expériences d'essai ; elles ont été faites lors de notre séjour à l'Institut d'Hygiène de Fribourg-en-Brisgau, dans le laboratoire du professeur Schottelius; celles de la 2e ont été exécutées par la suite dans notre laboratoire.

I

Après avoir été mis au courant très obligeamment par le professeur Schottelius et ses élèves des détails de leur installation et des connaissances techniques d'élevage qu'ils avaient pu acquérir, nous avons pensé à adopter, pour les expériences que nous voulions entreprendre, un dispositif particulier. Les conditions d'existence imposées à l'animal étant de la sorte différentes, il devenait plus aisé de dégager la part qui revient à celles-ci dans les résultats obtenus.

Pour ces essais à Fribourg, nous avons établi un appareil de fortune dont les petites dimensions nous ont permis de substituer à la stérilisation par l'aldéhyde formique et le soufre la stérilisation par la vapeur, comme pour les récipients à culture ordinaires ; cet appareil est muni d'une circulation d'air continue et rend possible l'apport journalier d'aliments et d'eau stériles.

Appareil (*Figure* 1) *et Technique*. — Une cuve de verre cylindrique, de 28 centimètres de diamètre et de 15 centimètres de hauteur, est munie d'un couvercle, d'un diamètre de 30 centimètres, en toile métallique avec rebord en fer-blanc de 5 centimètres de hauteur. Une épaisse feuille d'ouate placée dans le couvercle et le débordant de toute part est fortement comprimée entre sa toile métallique et une 2e toile métallique de 25 centimètres de diamètre, à l'aide de solides ligatures de mince fil de laiton. Le couvercle ne peut être mis en place qu'en comprimant fortement la feuille d'ouate entre le bord extérieur de la cuve et le rebord de fer-blanc du couvercle. Deux trous ménagés dans le couvercle laissent passer l'un : un tube rectiligne (A) en verre de 12 centimètres de long, de 2 centimètres de diamètre, placé obliquement, son orifice supérieur bouché au coton, son orifice inférieur s'ouvrant à 2 centimètres dans l'intérieur de la cuve ; l'autre : 2 tubes de 1 centimètre de diamètre, d'environ 25 centimètres de long et coudés à la hauteur de leur tiers supérieur; leur ouverture inférieure se trouve également à 2 centimètres de profondeur dans la cuve. Le 1er de ces tubes (C′) communique librement par un tube de caoutchouc avec un récipient d'eau (C) disposé en pissette, soigneusement bouchée et pourvue d'une rentrée d'air avec gros filtre de coton ; le 2e (E′) est muni d'un tampon de coton à son orifice supérieur qui est relié par (E) à une trompe à eau. Les 2 trous ménagés dans le couvercle sont tamponnés de coton, lequel est soigneusement ligaturé autour des tubes (A) (C′) (E′). En (F) se trouve un petit tube de bouillon devant servir de contrôle ; il n'a pas été utilisable dans la pratique.

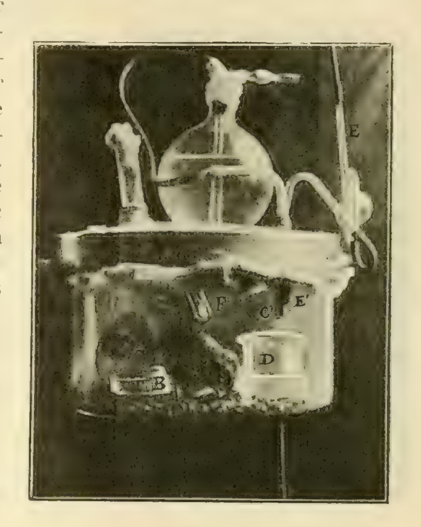


Fig. 1.

Avant la stérilisation, on répartit sur le fond de la cuve une couche de sable stérilisé une fois à l'autoclave et encore humide. Sur le sable, on dispose au-dessous de (A) une boîte de Pétri sans couvercle ; au-dessous de (C′), un autre récipient de verre de même diamètre, mais 3 fois plus haut.

La *figure* (2) représente le petit dispositif utilisé pour distribuer journellement la nourriture stérilisée. Un tube de verre de 3 centimètres de diamètre, à fond rond, et d'environ 15 centimètres de long, contient un 2e tube de verre de 1,5 centimètre de diamètre dans sa moitié inférieure, de 0,7 centimètre dans sa moitié supérieure, long de 15 centimètres, muni d'un filtre de coton dans sa partie amincie, bouché au coton à son ouverture inférieure. La partie amincie traverse le tampon de coton qui bouche le plus gros tube.

L'expérience comporte :

1° Des *élèves aseptiques* élevés dans l'appareil avec aliments et eau stérilisés.

2° Des *élèves témoins* non aseptiques élevés dans l'appareil avec aliments et eau stérilisés, mais souillés ensuite par les mains de l'expérimentateur et par l'exposition à l'air.

3° Des *élèves normaux* mis en éleveuse d'aviculteur avec aliments et eau non stérilisés.

Deux appareils, disposés comme il vient d'être dit, munis de leur récipient (C) et détachés de (E), sont enveloppés de serviettes pour la stérilisation. Ne disposant pas d'autoclave d'une dimension suffisante, ils sont stérilisés à deux reprises en marmite de Koch à 99° pendant 4 heures de suite.

Dès qu'un des œufs placés dans l'incubateur artificiel ordinaire est « bêché », ce qui se produit du 19e au 20e jour d'incubation, nous prenons six œufs non bêchés et que nous reconnaissons être bien vivants à l'aide du « mirage ». Nous les transportons dans un petit laboratoire lavé et fermé depuis la veille; là, nous procédons sans perdre de temps à leur désinfection sous l'abri d'une cage de balance vide et lavée au sublimé. La façon de procéder à cette désinfection, qui est celle employée par Schottelius, consiste à prendre les œufs avec des gants de caoutchouc stérilisés, à les brosser pendant 35 secondes avec une solution de sublimé à 5 p. 1000 chauffée à 40°, puis à les rincer avec de l'eau salée à 10 p. 1000 stérilisée et également à 40°. Chaque œuf, aussitôt désinfecté, est placé dans une boîte stérilisée, à culture sur pomme de terre. Pendant qu'un aide entr'ouvre délicatement le couvercle de l'appareil (dépouillé de sa serviette), nous déposons 3 œufs dans chacun des appareils. Ces 2 appareils sont placés aussitôt dans un rhéostat réglé à 40°, bien aéré et dans lequel est entretenu un degré d'humidité suffisant pour l'éclosion; le tube (E′) est mis en communication avec la trompe à eau. L'air de la cuve aspiré en (E′) est remplacé par l'air du rhéostat, qui se filtre par son passage à travers la couche d'ouate comprimée du couvercle.



Fig. 2.

Le lendemain de l'éclosion, on abaisse à 35 degrés la température du rhéostat et on donne aux poussins leur 1re nourriture. Dans ce but, on remplit chaque jour d'aliments la partie élargie du tube intérieur (fig. 2). Rebouché, celui-ci est replacé dans le gros tube et le tout est porté à l'autoclave pendant 25 minutes à 115 degrés. Au moment où les aliments sortis de l'autoclave sont encore tièdes, on adapte à la partie amincie du tube intérieur un tube de caoutchouc à l'aide duquel on fera glisser, par une insufflation, les aliments dans l'ouverture (A) de la cuve; ils tombent en (B).

Chaque jour également l'eau est distribuée en (D) par le tube (C′) relié à la pissette (C).

L'alimentation consiste pour tous les poussins de l'expérience en :

1er jour : rien.

2e jour : miettes de pain rassis, jaune d'œuf dur, le tout écrasé et mélangé.

3e jour : une partie du mélange précédent, une partie d'une pâtée spéciale (maïs, pomme de terre, riz, orge, laitue).

4e et 5e jours : même nourriture mouillée au lait.

6e jours : pâtée spéciale, millet, mouches.

7e, 8e, 9e, 10e, 11e, 12e jours : pâtée spéciale, œuf entier broyé, chicorée.

La lumière du jour arrive jusqu'aux poussins par la porte vitrée du rhéostat.

C'est par des déjections prises sur le sable par l'ouverture (A) et ensemencées en gélose Veillon que nous contrôlons la stérilité au cours de l'expérience.

Tous les 2 jours, la cuve des témoins est nettoyée, le sable lavé et séché.

Résultats. — Après divers échecs accidentels (éclosions manquées, saute à 46° du rhéostat, contamination, arrêt de la trompe à eau), nous avons obtenu une expérience dont tous les œufs, bien vivants, étaient de la même origine (Forêt Noire) et du même jour d'incubation.

Expérience du 22 juin 1907. — Fribourg.

(A) 3 œufs désinfectés : 2 poussins aseptiques (appareil, figure 1).
(B) 3 œufs désinfectés : 3 poussins témoins, non aseptiques (id.).
(C) 3 œufs non désinfectés : 3 poussins normaux (éleveuse d'aviculteur).

Un des élèves aseptiques (A) est moins développé et moins alerte que son compagnon. Des témoins (B), l'un, malade, meurt le 13e jour, les deux autres sont vifs et bien portants. Les élèves normaux (C) sont très différents, ils se montrent très vigoureux, plus développés que les A et les B.

Les déjections, débris alimentaires et plumes des (A) sont stériles le 9e jour, ceux des (B) et (C) contiennent d'innombrables bactéries aérobies et anaérobies avec grande prédominance de coli et de mesentericus.

Dès le 2e jour, un phénomène physique que nous n'avions pas prévu, met dans une très fâcheuse situation les poussins (A) et (B) élevés dans nos appareils. L'élévation de température produite dans la petite cuve de verre par la chaleur corporelle des animaux fait que la condensation de la vapeur d'eau se produit sur la paroi interne de l'appareil; il en résulte au fond de la cuve un mélange boueux formé de sable, d'aliments et de déjections, sur lequel les poussins piétinent constamment; leurs plumes souillées, restent collées au corps, et protègent mal contre le froid l'animal, qui frissonne sans cesse.

Pour la même cause, le coton de sûreté de l'extrémité supérieure de E' (aspiration d'air) s'humidifie, il est gagné peu à peu par de l'aspergillus niger venu du tube non stérile auquel cette extrémité est reliée. Devant ce danger imminent de contamination, nous sommes obligé d'arrêter l'expérience le 12e jour.

Les ensemencements des (A) faits en gélose Veillon aérobie et anaérobie avec des plumes, des déjections intestinales, du sable, de l'eau, des aliments, des coquilles d'œufs, du coton de l'appareil sont stériles. Les frottis ne décèlent la présence d'aucun microbe. Par contre, ceux du contenu intestinal des témoins dévoilent une flore bactérienne très abondante et très variée.

Poids respectifs.

(A) N° 1 = 54 gr. 70	(B) N° 1 = 54 gr. »	(C) N° 1 = 70 gr.
N° 2 = 37 gr. 50	N° 2 = 51 gr. 50	N° 2 = 64 gr.
	N° 3 = 40 gr. »	N° 3 = 68 gr.

Les poussins élevés stérilement n'ont nullement souffert par la suite. Transportés en France avec 2 témoins, ils y ont fait souche nombreuse.

La lecture des poids respectifs met en lumière un fait expérimental différent de ceux observés jusqu'alors sur un vertébré; il se trouve que les poussins stériles (A) et ceux non stériles (B) élevés les uns et les autres dans les mêmes conditions physiques ont augmenté au 12e jour, d'un poids moyen, sensiblement égal. Les stériles ont donc pu se développer sans l'aide des microbes; les microbes n'ont donc été d'aucun secours comme d'aucune gêne pour les non stériles.

Cette constatation (dont des expériences postérieures devaient nous donner par rapprochement avec elles toute la valeur) était faite sur des sujets âgés de si peu de jours qu'elle ne fut pour nous nullement probante: elle nous suggéra cependant la pensée qu'un dispositif nouveau basé sur le principe de notre petit appareil de fortune permettrait peut-être de mettre en évidence une série de faits nouveaux concernant l'élevage des vertébrés à l'abri des microbes.

II

L'infériorité du poids et du développement des poussins élevés dans nos deux petits appareils (A et B), par rapport aux poussins normaux (C) n'était certainement pas due uniquement à l'alimentation stérilisée. Les conditions d'existence, encore défectueuses, que nous leur avions imposées devaient intervenir

pour une large part. Pour réduire celle-ci au minimum, nous avons cherché à établir dans la suite un appareil qui offrît aux animaux en expérience de l'espace, de l'air pur sans cesse renouvelé, de l'eau fraîche, une mère artificielle à 38°-40°, une petite cour à température modérée, de la lumière en abondance; l'appareil, comparable à un récipient à culture, devait être facilement transportable et stérilisable à l'autoclave.

Grâce à M. P. Lequeux, qui parvint à surmonter de grandes difficultés de construction, nous avons atteint notre but, regrettant toutefois que les dimensions de l'appareil aient été forcément restreintes par les exigences de la fabrication. Il devient, en effet, passé le 40e jour d'élevage, une demeure trop exiguë pour les poulets.

L'appareil. — La figure représente l'appareil au 1/13 de sa grandeur. Il se compose de deux parties principales, un cylindre en verre et une chambre cylindrique en cuivre se faisant suite; à la partie inférieure de l'un et de l'autre est disposé un plateau métallique, à bords relevés de 1 centimètre, servant de *sol*. Le cylindre de verre, de 35 centimètres de diamètre et de 80 centimètres de longueur, représente la *cour* d'élevage, la chambre en cuivre de 25 centimètres de diamètre et de 25 centimètres de longueur sert de *mère* artificielle. La cour et la mère communiquent par une large ouverture devant laquelle est placé un rideau mobile, en laine, fendu en son milieu et muni dans le haut d'une glace de mica rendant visible l'intérieur de la mère. Sur la paroi postérieure de celle-ci est ménagée une ouverture pouvant laisser passer un œuf. La paroi de la mère est tapissée jusqu'au 2/3 de sa hauteur d'un épais carton d'amiante, ce qui permet à la chaleur de venir d'en haut, comme sous la poule.

Le cylindre de verre est maintenu en place par 2 plaques de bronze sur lesquelles ses bords rodés viennent s'appliquer hermétiquement par l'intermédiaire d'un joint de caoutchouc mou et de 4 tirants. Sur une des plaques de bronze s'ouvre à l'intérieur du cylindre et au-dessus de l'entrée de la mère, un orifice de 3 centimètres de diamètre pour l'entrée de l'air; à cet orifice est fixé extérieurement un bouchon de coton et intérieurement un bouchon de caoutchouc percé d'un trou et muni d'un tube de verre s'ouvrant d'un côté sur le coton, de l'autre au fond et en haut de la mère. Sur la plaque opposée sont disposés : au-dessous du plateau, un orifice de vidange de 3 centimètres, au-dessus du plateau, une ouverture permettant l'introduction de la main, une autre le passage d'un tube de verre de 2 centimètres de diamètre ou d'une pince. Chacune de ces ouvertures ainsi que celle de la mère pour le passage des œufs est munie extérieurement d'un tube de cuivre de diamètre correspondant et d'environ 10 centimètres de longueur; ce tube permet le bouchage au coton, ainsi que pour un tube de culture. Un petit grillage métallique mobilisable avec le bouchon de coton empêche les poussins de venir becqueter le coton. Chacun de ces tubes est entouré d'une chambre cylindrique faisant corps avec la paroi métallique : ces chambres sont munies d'un couvercle avec vis de pression et joint en caout-

chouc permettant une fermeture hermétique. Grâce à ce dispositif de fermeture et à celui du cylindre sur la plaque de bronze, l'appareil est étanche à volonté. Sur la chambre de l'orifice placé au-dessus de la mère et sur celle de l'ouverture pour le passage d'une pince est disposée une amorce avec robinet : l'une sert à l'entrée, l'autre à la sortie de l'air filtré. Un cercle en cuivre ayant un diamètre supérieur de 2 cm. au diamètre du cylindre de verre est fixé par la plaque de bronze ; il permet de bourrer entre le cylindre et soi-même un cordon d'ouate destiné à empêcher la pénétration des microbes dans l'appareil au cas où l'étanchéité du joint serait accidentellement imparfaite. A la plaque de bronze placée à droite sur la figure, est fixé un serpentin en tube de cuivre nickelé d'un diamètre et d'une longueur déterminés, servant de réfrigérant à eau ; il pénètre horizontalement dans le haut du cylindre et en sort sans que sa cavité intérieure ne communique en aucun point avec l'intérieur de l'appareil. Une gouttière de même métal fixée au-dessous du serpentin est disposée de façon à recueillir les gouttes d'eau de condensation.

Sur le plateau, ou sol, de la cour est disposé, comme tout accessoire, contre la plaque droite, un petit baquet en argent pourvu de godets latéraux, d'un couvercle percé d'un trou et d'une vidange placée à 1 millimètre au-dessous du bord des godets. Le sol de la mère forme un bourrelet de 1 centimètre de hauteur au niveau du rideau ; il est percé de 2 trous munis d'une amorce inférieure, l'un près du fond, l'autre près de la cour ; il est de plus recouvert d'une épaisse toile de lin, recouverte elle-même d'une toile de nickel marquée d'une dépression médiane faite pour recevoir les œufs. Un tube de caoutchouc partant de la gouttière et aboutissant au trou du couvercle de l'abreuvoir y déverse l'eau de condensation : un autre tube de caoutchouc passant sous le plateau conduit l'eau de la vidange de l'abreuvoir à l'amorce antérieure du sol de la mère : l'eau, après avoir imbibé la toile de lin gagne l'amorce postérieure, munie elle-même d'un tube court par lequel l'écoulement se fait dans l'espace laissé libre entre le plateau et le cylindre. Un fil de lin parcourant toutes ces petites canalisations assure par capillarité l'écoulement de l'eau. Un thermomètre est suspendu horizontalement à la hauteur des œufs dans la mère ; ses degrés sont visibles en dehors du rideau, dans la cour. Un autre thermomètre vertical est fixé à la gouttière.

L'appareil est entièrement stérilisable à 120 degrés par la vapeur sous pression.

Un réservoir cylindrique en forme de gaine s'engage autour de la mère : il est muni d'un régulateur qui commande une petite rampe de gaz à flamme blanche placée au-dessous du réservoir. Le réservoir et la rampe sont recouverts librement d'une toile d'amiante.

L'appareil est placé sur une table à la hauteur et près de la fenêtre dans le laboratoire d'expériences.

Une « avant-chambre » de toile caoutchoutée, stérilisable au sublimé, est destinée aux manipulations diverses, faites aseptiquement en dehors de tout flambage. Elle mesure 60 centimètres de côté, elle est cubique. Une de ses faces verticales est pourvue d'une ouverture circulaire à coulisse destinée à recevoir et à enserrer la chambre précédant les ouvertures de l'appareil. Elle est munie de deux fenêtres de mica, l'une sur la paroi supérieure, l'autre sur la paroi faisant face à l'ouverture circulaire.

Installation et accessoires. — Le *laboratoire* d'expériences est transformé en étuve à température constante, à l'aide d'un calorifère à air chaud, com-

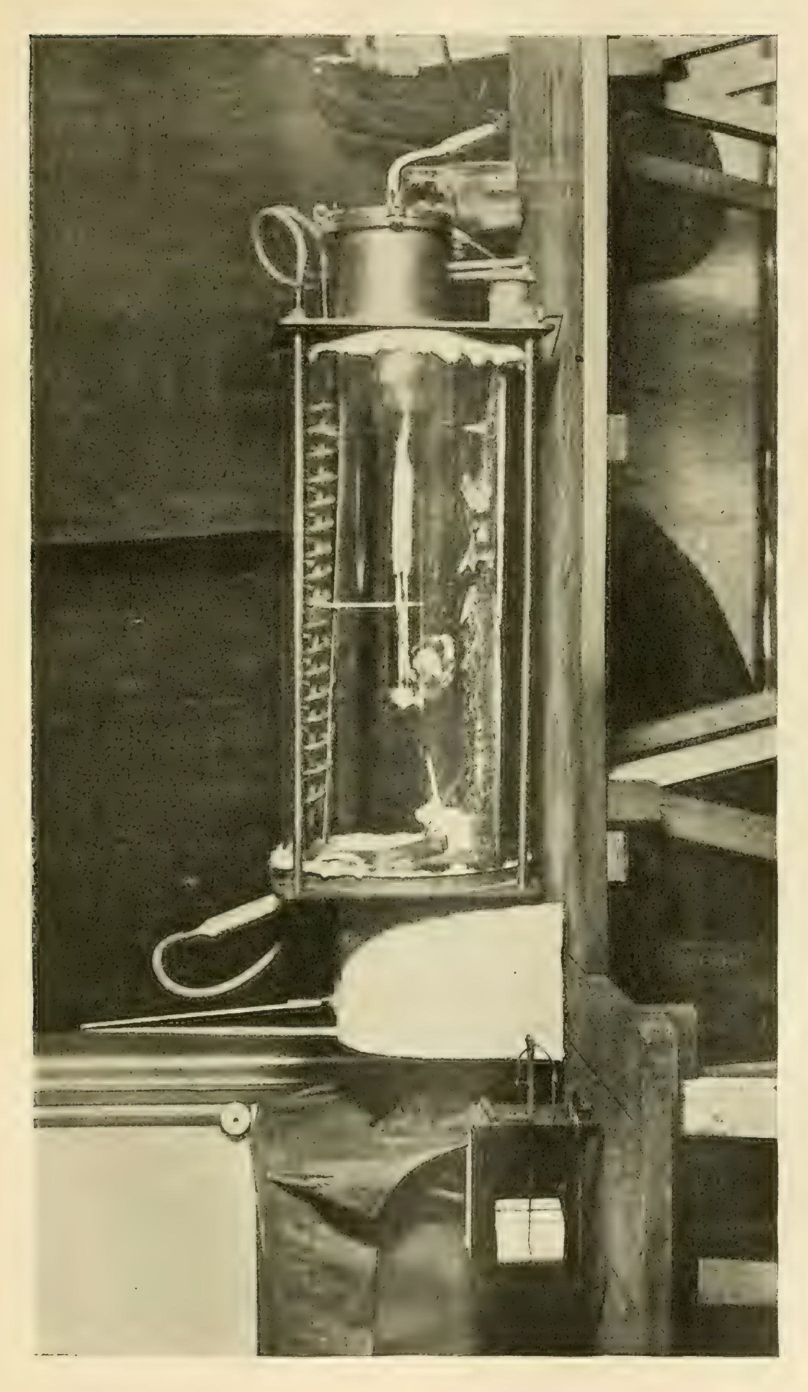


FIG. 3.

mandé par un régulateur à gaz et aménagé de telle sorte que sa prise d'air soit extérieure et que les gaz de combustion soient conduits au dehors. Le laboratoire mesure 65 mètres cubes environ ; une grande fenêtre unique, large de 2 mètres, est exposée à l'est. Porte et fenêtre sont garanties par un double rideau mobile, leurs interstices sont calfeutrés. Toute circulation d'air et partant des poussières peut donc être évitée.

Un thermomètre enregistreur est placé à côté de l'appareil.

Diverses canalisations en verre ou caoutchouc sont reliées à l'appareil. L'une s'ouvrant à l'air extérieur, à près de 1 mètre de distance du bâtiment, aboutit à l'amorce de gauche ; elle est destinée à déverser de l'air pur dans l'intérieur de la mère ; sur cette canalisation sont branchés deux filtres de coton faits avec des tubes de verres de 3 centimètres de diamètre et de 35 centimètres de long; en dérivation est mis un barboteur témoin, rempli d'une solution de sublimé et protégé en outre par un troisième filtre d'air. Deux tuyaux de plomb conduisent de l'eau, l'un du robinet de débit au réfrigérant condensateur, l'autre du réfrigérant condensateur à l'évier.

La mise au point de notre installation a été faite à l'aide d'essais répétés d'éclosions d'œufs et d'élevages non stériles.

Un incubateur électrique reçoit les œufs jusqu'à leur mise en place dans l'appareil.

Les œufs fécondés (que nous nous procurons à grand'peine pendant l'automne et l'hiver) proviennent de races pures, « Faverolles » ou « Houdan » ; quand cela est possible, nous choisissons de préférence cette dernière à cause de sa plus petite taille.

Technique expérimentale. — Elle comporte deux séries d'élevages, une pendant laquelle nous avons donné à nos poussins une alimentation distribuée chaque jour, l'autre pour laquelle nous avons disposé à l'avance sur le sol de la cour une quantité de nourriture suffisante pour toute la durée présumée de l'élevage. Nous avons voulu éviter ainsi, dans cette 2e série, la cause principale de contamination. De ce fait, les conditions de l'élevage devenaient moins favorables. Nos petits élèves devaient en souffrir dans une proportion qu'il nous serait facile de fixer par comparaison avec les élevages de la 1re série. Dans celle-ci, l'alimentation n'a pas été d'un type uniforme, nous la décrivons en relatant les élevages stériles. Stérilisée à 115° degrés pendant 25 minutes dans un tube de verre de 2,5 centimètres, muni d'un piston, elle est propulsée dans l'appareil à travers la petite ouverture de gauche protégée par l'avant-chambre. Pour la 2e série, elle est stérilisée en même temps que l'appareil. Elle consiste uniformément en un mélange de graines diverses; chardon, sorgho, millet blanc, millet rouge, chènevis, ortie, moha, alpiste, lin. Afin de faire éclater leur enveloppe et les rendre plus sûrement stérilisables, elles sont d'abord immergées dans l'eau bouillante et mise de la sorte à « gonfler » pendant deux heures. Essorées et mélangées à du sable lavé et encore humide, elles sont aussitôt répandues sur le sol de la cour, juste avant la stérilisation.

En même temps, on place dans l'appareil, sur la gouttière et au-dessous du serpentin, une boîte de Petri, sans couvercle, contenant de la gélose sucrée, et deux tubes ouverts, remplis de bouillon. Boîte et tubes serviront de témoins d'aseptie ; la dessiccation de la gélose sera évitée au cours de l'expérience, grâce aux gouttes d'eau de condensation tombant des spires du serpentin, placées directement au-dessus de la boîte de Petri. Les deux amorces, ouvertes, sont protégées par du coton ; les couvercles des chambres, fermés, sont enveloppés d'une serviette.

Ces préparatifs terminés, on transporte, à l'aide d'un brancard, l'appareil dans un grand stérilisateur Vaillard. La stérilisation se fait par la vapeur à 118° pendant 1 h. 30 minutes.

Ensuite l'appareil est replacé dans le laboratoire d'expériences, et relié aux diverses canalisations. Les écrous des couvercles et des tirants de bronze sont resserrés; la trompe à eau à l'aide de laquelle se fait la circulation d'air dans l'appareil, est mise en action, le réservoir cylindrique est engagé autour de la mère, son régulateur est mis en marche. Le calorifère de la pièce est allumé plusieurs jours à l'avance.

Le régulateur du laboratoire, le régulateur et le réfrigérant de l'appareil sont disposés de façon à obtenir, le jour de la mise en place des œufs (la veille de l'éclosion) et les deux jours suivants, une température de 30° dans le laboratoire, 40° dans la mère, 27° dans la cour. De cette manière, la température de la cour étant inférieure à celle du laboratoire, la condensation de la vapeur d'eau ne se fait pas, comme dans notre appareil d'essai, sur la paroi intérieure du cylindre de verre; l'asséchement de la nourriture et du sable est terminé le 3e jour après la stérilisation.

Le débit d'air pur circulant dans l'appareil est abondant, près de 3 litres par minute.

La *mise en place* des œufs est d'une pratique délicate :

A l'aide de sa coulisse, on fixe l'avant-chambre à la chambre de l'ouverture des œufs, de façon à ce que le couvercle de bronze puisse s'ouvrir à l'intérieur de l'avant-chambre. Suivant l'antique procédé de Lister pour ses opérations chirurgicales, on pulvérise dans l'avant-chambre de la solution au sublimé à 5 p. 1000. Ceci fait, on arrête le réfrigérant et on ferme le robinet des amorces pour le passage de l'air, afin d'établir à l'intérieur de l'appareil une légère élévation de température produisant une tension d'air suffisante pour qu'il y ait refoulement, de l'intérieur à l'extérieur, au moment de l'ouverture de la chambre aux œufs. Les œufs, au nombre de 3 ou de 4, sont introduits dans l'avant-chambre, stérilisés d'après le procédé de Schottelius (1), procédé parfaitement inoffensif pour le poussin. Ils sont introduits successivement, aussitôt après leur stérilisation, dans un verre de lampe régulièrement cylindrique, bouché de coton à chaque extrémité et stérilisé. Le couvercle de bronze est ouvert; on débarrasse rapidement de ses cotons le verre de lampe tenu horizontalement en face de l'ouverture aux œufs; ayant débouché celle-ci on y engage quelque peu le verre de lampe, puis on pousse les œufs dans la mère à l'aide d'une baguette stérile introduite dans le verre de lampe. Les œufs viennent se placer dans la dépression ménagée sur la toile de nickel. Le bouchon de coton de l'ouverture, remis en place, on ferme le couvercle de bronze. Cette technique, suivie pendant la 2e série des élevages, est un peu différente dans la 1re série, où les œufs désinfectés au nombre de 4 ou de 5, sont transportés dans la mère à l'aide d'une pince appropriée à cet usage.

Pendant les manipulations, les mains et les avant-bras recouverts de gants de caoutchouc à longs crispins sont seuls introduits dans l'avant-

(1) Ce mode de désinfection (v. p. 110) n'a aucun effet nuisible ni sur l'éclosion ni sur le développement consécutif de l'animal. Il en est de même de la désinfection au $KMnO^4$ que nous avons tentée (brossage des œufs 35 minutes avec la solution à 40 degrés : $KMnO^4$ 1 g.; HCl, 0 g. 5; eau distillée, 100 centimètres cubes). Celle-ci ne présentant cependant aucun avantage, nous nous en sommes tenu à la première.

chambre. Etant dans cette position, la fenêtre de mica placée sur la paroi postérieure de l'avant-chambre se trouve près du visage et permet de voir l'intérieur éclairé par la 2e fenêtre, située sur la paroi supérieure.

La mise en place des œufs terminée, condensateur et circulation d'air sont remis en marche. L'œuf trouve dans la mère la chaleur (40°), le degré hygrométrique (environ 0,80) et l'air pur nécessaire à l'achèvement de son incubation.

A partir de ce moment, une surveillance de jour et de nuit est préférable, si l'on veut éviter qu'un incident imprévu ne vienne influencer la température de la mère et n'empêche l'*éclosion*. Le lendemain de celle-ci, on abaisse la température à 36° dans la mère, 24° dans la cour, 27° dans le laboratoire; 8 jours après, on ramène la mère à environ 32°, la cour à 22°, le laboratoire à 25°.

Quelques heures à peine après l'éclosion, les poussins viennent spontanément écarter le rideau qui les sépare de la cour. Dès le lendemain, ils circulent dans la cour, picorent, vont à l'abreuvoir et regagnent d'eux-mêmes la mère. Cependant pour que *les élèves de l'appareil* soient « bien venus » il faut prendre en quelque sorte la place de la mère poule, leur rendre de fréquentes visites, leur faire prendre de l'exercice en les faisant courir le long du cylindre à la poursuite de la main. En dehors de ces obligations « maternelles » les élevages du type de la 2e série ne demandent, pendant toute leur durée, aucune intervention, mais simplement une surveillance des débits d'eau et de gaz.

Chaque expérience comprend en dehors des élèves de l'appareil, des éléves témoins et des élèves normaux. Tous proviennent de la même origine et de la même couvée.

Les *élèves témoins*, en nombre inférieur à 5, sont élevés dans des conditions aussi voisines que possible de celles de l'élevage stérile, sans cependant être placés dans un appareil identique; les difficultés du nettoyage, indispensable tous les 2 jours, rendaient la chose impossible. Après avoir été désinfectés au sublimé, les œufs des témoins sont mis à nouveau dans l'incubateur électrique. Après l'éclosion, les poussins sont « séchés », puis placés dans leur éleveuse, constituée par une mère chauffée électriquement, communiquant par l'intermédiaire d'un rideau avec une petite cour, l'une et l'autre de la dimension de celles de l'appareil à élevage stérile. Ils reçoivent une nourriture identique à celle du poussin de l'appareil : pour la 1re série, elle est renouvelée chaque jour, mise en tube de verre et stérilisée pendant 25 minutes à 115°; celle de la 2e série est préparée en quantité suffisante pour toute la durée présumée de l'expérience, mélangée à du sable fin lavé, stérilisée pendant 1 h. 30, asséchée, mise en provision à l'abri des poussières et distribuée par fraction surabondante à chaque nettoyage. De l'eau distillée, fréquemment remplacée, est disposée dans un petit abreuvoir placé sur le sol de la cour. La pièce où se trouvent les témoins est portée à l'aide d'un radiateur à vapeur à une température voisine de celle de la cour de l'appareil à élevage stérile; elle est largement aérée. Les poussins sont visités chaque jour.

Les *élèves normaux* sont placés dans la même pièce que les élèves témoins. La mère et la cour de l'éleveuse sont plus spacieuses. La nourriture, de même nature, n'est pas mise dans l'eau bouillante ni stérilisée; elle est remplacée chaque jour pour la 1re série, fréquemment pour la deuxième. De l'eau de source remplace l'eau distillée. Les œufs n'ont pas été désinfectés.

Le *contrôle*, dans le cours de l'expérience, est fait à l'aide des tubes de

bouillon et de la gélose disposés, ouverts, dans l'appareil ; nos contaminations voulues ou accidentelles ont toujours été décelées en moins de quatre jours par les bouillons ou la gélose ainsi que par l'odeur de l'air entraîné par la trompe et venant de l'appareil ; cet air est inodore pendant l'asepsie. Tous les cinq jours pendant l'élevage de la 1re série, des prises de déjections ou de détritus sont faites avec une pince par le petit orifice de droite, muni de l'avant-chambre, et ensemencées en gélose Veillon aérobie et anaréobie.

Un contrôle général de l'asepsie est fait à la fin de l'expérience. Dans la crainte de laisser passer quelque imperfection dans ce contrôle final, nous avons demandé l'assistance de notre maître le professeur Metchnikoff et de nos camarades Besredka et Salimbeni ; voici la technique à laquelle nous sous sommes arrêté :

Le jour fixé pour la fin de l'expérience, nous adaptons un barboteur de chloroforme à l'entrée du filtre commandant le barboteur témoin d'entrée d'air ; celui-ci est mis en action et bientôt l'animal meurt chloroformé. A l'aide d'un crochet stérile, on ramène au besoin le poulet près de la grande ouverture de droite ; là il est pris avec une pince et mis en boîte stérile. On recueille en même temps des déjections, des débris d'œuf, des graines, des plumes, de l'eau de l'abreuvoir, de l'ouate des bouchons ainsi que la boîte de gélose elle-même. Cette opération se fait à l'abri de l'avant-chambre comme toutes celles, du reste, nécessitant l'ouverture d'une des chambres.

Les animaux étant pesés, des ensemencements sont faits en bouillon, en gélose inclinée, en gélose Veillon profonde, afin de déceler la présence des aérobies et des anaérobies, avec le sang du cœur, avec le contenu de l'estomac, du duodénum, de l'iléon, du cæcum, du rectum, avec les pattes, les ailes, le bec et toutes déjections, eau et débris divers puisés dans l'appareil. Le tout est laissé à l'étuve pendant cinq jours.

Comme garantie de la qualité du milieu de culture, on ouvre quelques-uns des tubes stériles ; ils doivent se contaminer rapidement.

Des préparations sont faites en même temps que les ensemencements.

L'état des organes est noté pendant l'autopsie.

On prend également le poids des témoins et celui des poussins de l'élevage normal. Un des témoins est autopsié ; le contenu de son tube digestif est examiné sur préparation et ensemencé.

Observation. — Nous avons rencontré une fois à l'examen des préparations de déchets provenant de l'appareil quelques rares formes microbiennes prenant le Gram. Comme nos ensemencements étaient stériles, nous avons pensé que ces bactéries pouvaient être vivantes, mais ne pas pousser dans nos milieux. Il n'en était rien. Du genre Sporogenes Metchnikovii, ces microbes se trouvaient, avant la stérilisation, dans le sable où nous avons pu les isoler. Ils se sont très bien accommodés des milieux de cultures du contrôle.

Les élevages stériles. — Sans entrer dans l'énumération des écueils que nous avons rencontrés, il est aisé de comprendre que le succès de l'expérience dépend de facteurs très divers qu'il n'est pas facile de grouper ou d'écarter à sa guise ; comme exemple, nous ne donnerons que l'influence défavorable, sur les éclosions, de toute saison autre que le printemps.

Ceci explique pourquoi nos élevages stériles n'ont pas été effectués en aussi grand nombre que nous l'eussions voulu.

(Première série). — *Expérience du* 12 *mai* 1908 (Œufs de Faverolles).

(A). 3 œufs désinfectés : 1 poussin (appareil d'élevage stérile).
(B). 3 œufs désinfectés : 3 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 5 œufs non désinfectés : 3 poussins (éleveuse normale).

Un seul poussin sur 3 œufs est né dans l'appareil par suite du manque accidentel d'humidité dans la « mère ».

L'alimentation journalière préparée avec moitié aliments secs, moitié eau chaude est, comme il a été dit, stérilisée à 115 degrés pendant 25 minutes pour (A) et (B), non stérilisée et servie tiède pour (C). Elle consiste en :

Le 13 et le 14 mai : rien.

Le 15 : œuf écrasé et sable.

Le 16, 17, 18 : œufs, farine spéciale Spratt's, sable.

Le 19 : farine Spratt's, sable, riz, lait, graines Spratt's.

Le 20, 21, 22, 23 : farine Spratt's, œufs.

Le 24, 25, 26, 27, 28 : farine et graines Spratt's, 8 mouches.

Le 29, 30, 31 mai, le 1er, 2 juin : farine Spratt's, œufs, sable, salade.

Le 3, à 9 heures du matin : œufs, sable.

Les prises de contrôle sont faites les 4e, 10e et 15e jours. Les géloses couchées et profondes restent stériles.

Le sacrifice est fait par le chloroforme à 10 heures du soir. L'expérience n'est pas poussée plus avant par crainte de contamination semblable à celles survenues du 12e au 18e jour dans des expériences précédentes.

L'animal est très gai, très vigoureux pendant les 20 jours de l'expérience. *Il paraît plus développé que les témoins* (B). Il est également plus vorace. Les déchets alimentaires semblent être rendus en plus grande abondance. Leur aspect est très particulier, en ce sens que l'urine n'est jamais trouble et ne se mélange pas aux fèces toujours bien formées.

A l'autopsie, les organes se montrent en bon état.

Sur les préparations du contenu intestinal, on ne voit aucune bactérie. Elles décèlent par contre de très nombreux déchets

alimentaires. Le duodénum contient de nombreux noyaux cellulaires. Ce fait que nous avons déjà observé chez un jeune perroquet à alimentation normale, ne se reproduit pas avec la même netteté dans les autopsies des expériences suivantes.

Les ensemencements sont stériles le 5e jour d'étuve et se maintiennent stériles au laboratoire par la suite.

Poids respectifs au 20e jour.

(A). N° 1 = 106 gr.	(B). N° 1 = 85 gr.	(C). N° 1 = 84 gr. (une patte crochue).
	N° 2 — (mort le 24 mai).	N° 2 = 104 gr.
		N° 3 = (mort le 20 mai).

Expérience du 21 *juillet* 1908 (Œufs de Faverolles).

(A). 5 œufs désinfectés : 2 poussins (appareil).
(B). 5 œufs désinfectés : 4 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 5 œufs non désinfectés : 4 poussins (éleveuse normale).

La cause de la mauvaise éclosion dans l'appareil nous est inconnue.

L'alimentation est préparée et distribuée de même que dans l'expérience du 12 mai. Elle consiste en :

Le 21, 22 juillet : rien.

Le 23, à 8 heures du soir : blanc et jaune d'œuf écrasés et sable.

Le 24, 25, à 3 heures du soir : blanc et jaune d'œuf et farine Spratt's.

Le 26, à 9 heures du matin : farine Spratt's, 8 mouches par poussin, sable.

Le 27, à 1 heure du soir : farine Spratt's, œuf entier broyé, sable.

Le 28, à 1 heure du soir : farine et graines Spratt's, sable, riz, lait.

Le 29, à 11 heures du soir : farine et graines Spratt's, sable, lait, graines.

Le 30, 31, à 1 heure du soir : farine Spratt's, sable, 6 mouches par poussin.

Le 1er août, le 2 : farine Spratt's, œuf entier broyé.

Le 3, 4 : farine Spratt's, œuf entier broyé, salade.

Le 5e et 10e jour, des prises de matières sont faites dans l'appareil; elles sont stériles.

Jusqu'au 15e jour, les 2 poussins (A) sont bien portants, très vifs, et semblent au moins aussi développés que les témoins (B). Comme les 2 (A) paraissent d'une taille identique nous en retirons un de l'appareil (après engourdissement au chloroforme) à l'aide d'une pince, par la grande ouverture de droite, avec l'intention de laisser le 2e jusqu'au 30e jour. L'opération ne se fait pas sans difficulté. L'animal est mis dans une cloche à pomme de terre stérilisée contenant du chloroforme aseptique. Il est pesé, autopsié, ensemencé ainsi que les déchets et matières fécales. Les tubes de culture, gélose Veillon et bouillon avec blanc d'œuf, restent stériles.

Par contre, 2 espèces microbiennes ont pénétré dans l'appareil pendant nos manipulations; elles sont décelées le 9 août par la gélose contrôle de l'appareil. L'élevage stérile ne comporte donc que les résultats du 15e jour.

L'autopsie du poussin stérile ne révèle rien d'anormal, ses organes ne diffèrent pas de ceux du témoin sacrifié.

Poids respectifs au 15e jour.

(A). N° 1 = 75 gr.	(B). N° 1 = 60 gr.	(C). N° 1 = 64 gr.
N° 2 = ?	N° 2 = 81 gr.	N° 2 = 69 gr.
	N° 3 = 68 gr.	N° 3 = 58 gr.
	N° 4 — (retiré le 23 juillet).	N° 4 = 71 gr.

(Deuxième série). — *Expérience du 24 octobre* 1909 (Œufs de Faverolles).

(A). 3 œufs désinfectés : 1 poussin (appareil).
(B). 2 œufs désinfectés : 2 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 1 œuf non désinfecté : 1 poussin (éleveuse normale).

L'eau de condensation n'ayant pas eu le temps de gagner le sol de la mère, le manque d'humidité entrave l'éclosion dans l'appareil.

Le poussin (A), assez chétif pendant les premiers jours, devient rapidement vigoureux. Un des témoins (B) meurt le 5e jour. L'appareil n'est pas ouvert pendant toute la durée de l'expérience, soit 33 jours.

L'animal est sacrifié au chloroforme. Tous les ensemencements sont aseptiques.

Le 33e jour, le poulet (A) est bien portant et présente cependant une légère raideur des jambes; (B) a les deux coudes presque totalement ankylosés; le (C) est très bien portant, son plumage est plus développé.

Poids respectifs au 33e jour.

(A). N° 1 = 89 gr.	(B). N° 1 = 108 gr.	(C). N° 1 = 125 gr.
	N° 2 = (mort le 10 décembre).	

Expérience du 10 *juin* 1910. (Œufs de ? — pas noté.)

(A). 5 œufs désinfectés : 4 poussins (appareil).
(B). 5 œufs désinfectés : 5 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 4 œufs non désinfectés : 4 poussins (éleveuse normale).

Dès le 5e jour, 2 des animaux de l'appareil sont haletants, tous les 4 semblent souffrir, ils mangent très peu ; les témoins (B) et les poussins (C) sont très vigoureux. Le 6e jour, un des (A) meurt, un autre meurt le 8e jour. Les barboteurs témoins démontrent que, pour une cause qui nous échappe, une très faible quantité d'air passe dans l'appareil. Les 2 survivants sont chétifs, visiblement éprouvés par le manque d'air; ils ont les ailes pendantes, mais ils sont cependant assez vivaces; le 40e jour, nous clôturons l'expérience.

L'autopsie nous montre que le foie, les poumons et le tube digestif des (A) sont très anémiés. Les ensemencements ne donnent aucune culture.

Poids respectifs au 40e jour.

(A). N° 1 = 50 gr.	(B). N° 1 = 180 gr.	(C). N° 1 = 162 gr.
N° 2 = 48 gr.	N° 2 — 112 gr.	N° 2 = 145 gr.
N° 3 = (mort le 16 mai).	N° 3 = 125 gr.	N° 3 = 178 gr.
N° 4 = (mort le 18 mai).	N° 4 = 123 gr.	N° 4 = 130 gr.
	N° 5 = (mort le ?).	

Observation. — L'examen de l'appareil démonté nous a permis de constater que l'amorce de sortie (aspiration) d'air était en partie obstruée.

Expérience du 5 *mars* 1911 (Œufs de Houdan).

(A). 3 œufs désinfectés : 2 poussins (appareil).
(B). 5 œufs désinfectés : 5 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 3 œufs non désinfectés : 3 poussins (éleveuse normale).

De petits fragments de viande et de graisse sont ajoutés à l'alimentation de (A) (B) (C) dans le but de la rendre plus riche. Cette graisse, fondue pendant la stérilisation, fait prise au refroidissement et forme à la surface des aliments une croûte très dure et en partie inattaquable par les poulets. De ce fait ceux de (A) et de (B) ont une grande difficulté à se nourrir. Un des (B), malingre dès le début, meurt le 19e jour. Les poulets (A) sont bien portants pendant les trois premières semaines. Le 25e jour, l'un d'eux est moins vif, ses pattes sont anémiées, ses plumes par instants se hérissent, il porte l'aile basse; il en est de même chez deux témoins (B). Le sacrifice est fait le 9 avril, 35e jour.

A l'autopsie, le n° 2 des poulets (A) et les nos 1 et 4 des (B) sont très anémiés. Les cultures de contrôle sont stériles.

Poids respectifs au 35e jour.

(A). N° 1 = 69 gr.	(B). N° 1 = 63 gr.	(C). N° 1 = 71 gr.
N° 2 = 64 gr.	N° 2 = 69 gr.	N° 2 = 123 gr.
	N° 3 = 79 gr.	N° 3 = 70 gr.
	N° 4 = 51 gr.	
	N° 5 = (mort le 24 mars).	

Expérience du 17 *avril* 1911 (œufs de Houdan).

(A). 3 œufs désinfectés : 3 poussins (appareil).
(B). 4 œufs désinfectés : 4 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 2 œufs non désinfectés : 2 poussins (éleveuse normale).

Les poussins (A) sont très vivaces dès le lendemain de l'éclosion. Le 5e jour, des graines projetées par les poussins avec leurs pattes pénètrent dans l'abreuvoir et viennent se placer entre le tube d'arrivée d'eau et la vidange. L'eau imbibant les graines remonte par capillarité jusqu'à la vidange, ce qui fait que les godets où les animaux viennent boire restent vides. Un des poulets souffre dès le lendemain de la soif; couché sur le flanc le surlendemain, il met 5 jours à mourir. Les deux autres, plus alertes, saisissent en bondissant de rares rares gouttes d'eau suspendues à la gouttière et se formant là chaque jour. Ces quelques gouttes de boisson sont insuffisantes, les animaux sans cesse assoiffés font des efforts inutiles pour se procurer de l'eau à l'abreuvoir; ceci nous oblige à arrêter l'expérience, le 22e jour.

L'autopsie du n° 1 de (A) ne révèle rien d'anormal, celle du n° 2 n'est pas faite. Les organes du n° 3 mort depuis 10 jours sont presque exangues et fort diminués de volume, mais — ainsi qu'il était facile de le prévoir par suite de l'absence de bactéries — n'ont subi aucune altération; seule la paroi du duodénum, de l'iléon et du cæcum est amincie, friable et semble avoir été en partie digérée. Son contenu intestinal ainsi que toutes les autres prises (habituelles) sont stériles.

Poids respectifs au 22ᵉ jour.

(A). N° 1 = 58 gr.	(B). N° 1 = 60 gr.	(C). N° 1 = 62 gr.
N° 2 = 57 gr.	N° 2 — 57 gr.	N° 2 = 82 gr.
N° 3 = (mort le 29 avril).	N° 3 = 83 gr.	
	N° 4 = 62 gr.	

Observation. — Les témoins n'ont été privés d'eau à aucun moment de l'expérience.

Expérience du 7 juin 1911 (œufs de Houdan).

(A). 3 œufs désinfectés : 2 poussins (appareil).
(B). 4 œufs désinfectés : 4 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 5 œufs non désinfectés : 5 poussins (éleveuse normale).

Les poulets (A) paraissent identiques aux (B) et aux (C) jusqu'à une période de temps où ils sont privés d'eau à trois reprises différentes; la première pendant 1 jour, la deuxième et la troisième pendant 2 jours. Ce manque d'eau provient de l'élévation à 20 degrés de la température de l'eau du réfrigérant rendant impossible la condensation. Les témoins (B) ne reçoivent pas de boisson pendant le même laps de temps. Ces privations répétées affaiblissent les (A) et les (B); ils manquent d'appétit et d'entrain. Ce n'est que le 3ᵉ jour après les deux dernières journées d'assoiffement (17 juillet) qu'ils retrouvent leur bonne allure. Ils restent bien portants jusqu'au 22 juillet, jour du sacrifice (45ᵉ jour).

Les (A) et les (B) présentent le même développement.

A l'autopsie, on trouve les organes des uns et des autres assez fortement anémiés.

Poids respectifs au 45ᵉ jour.

(A). N° 1 = 74 gr.	(B). N° 1 = 62 gr.	(C). N° 1 = 80 gr.
N° 2 = 58 gr.	N° 2 = 57 gr.	N° 2 = 80 gr.
	N° 3 = 58 gr.	N° 3 = 77 gr.
	N° 4 — 57 gr.	N° 4 = 99 gr.
		N° 5 = 92 gr.

Observation. — La différence de poids très sensible entre les (A) et les (B) d'une part, les (C) de l'autre est exceptionnelle. Nous croyons pouvoir l'attribuer à la privation de boisson supportée par les (A) et les (B), seuls.

Les élevages en cultures pures. — Parmi les contaminations accidentelles survenues en cours d'expérience, quelques-unes ont été des cultures pures. De ce fait, ces expériences sont entrées d'elles-mêmes dans le cadre des recherches que nous comptons entreprendre ultérieurement sur l'action exercée par divers microbes isolés ou symbiosés sur l'animal stérile. Nous les relatons ici parce que les bactéries introduites étant connues comme saprophytes ou comme faiblement pathogènes, ces expériences nous renseignent, dans une certaine mesure, sur les effets que la vie sans microbes, plus ou moins prolongée, peut produire sur la sensibilité (à l'infection) de l'animal.

Elles ont été faites pendant la deuxième période de nos expériences. Pour les deux premières, nous avons suivi la technique de la première série (alimentation fréquemment renouvelée); pour les autres, celle de la deuxième série (alimentation donnée une fois pour toutes).

(**Première série**). — *Expérience du* 21 *juillet* 1908 (œufs de Faverolles). — Symbiose de coli commune d'Escherich et de mesentericus fuscus de Flügge.

La première partie de cette expérience se trouve décrite dans l'expérience de la même date, des élevages stériles. La contamination se fait le 15ᵉ jour pendant la prise d'un des deux poussins aseptiques.

L'expérience se continue pendant 10 jours, jusqu'au 15 août. L'alimentation donnée seulement tous les deux jours se compose uniformément de farine Spatt's et de salade.

L'aspect du poulet de l'appareil n'a pas changé; il reste en parfaite santé ainsi que les témoins. Tous les ensemencements et la gélose de l'appareil donnent du mesentericus fuscus et un coli ordinaire.

Poids respectifs au 30e jour.

(A). N° 1 = (sacrifié le 5 août).	(B). N° 1 = (sacrifié le 5 août).	(C). = ?
N° 2 = 91 gr.	N° ? = 102 gr.	
	N° ? = 90 gr.	

Expérience du 28 *juin* 1909 (œufs de Houdan). — Streptocoque de Grötenfeld *alias* entérocoque.

(A). 4 œufs désinfectés : 4 poussins (appareil).
(B). 4 œufs désinfectés : 4 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 5 œufs non désinfectés : 5 poussins (éleveuse normale).

La nourriture est donnée tous les deux jours; sa composition, qui n'a pas été notée chaque jour, se rapproche de celle du 21 juillet 1908. Les prises de déchets et de fèces faites dans l'appareil le 8e et le 14e jours sont aseptiques.

Sur la plaque de gélose, en partie desséchée, de très petites colonies sont visibles seulement le 26 juillet (28 jours). La troisième prise faite le 27e jour, révèle la présence d'un petit diplocoque prenant le Gram, identifié par la suite avec le streptrocoque de Grötenfeld. En raison de l'abondance des microbes contenus dans les déchets, nous estimons que la contamination s'est produite peu de temps après la deuxième prise, entre le 14e et le 22e jour.

Les animaux de l'appareil font preuve de la même turbulence et du même bon appétit pendant toute la durée de l'expérience, du premier au dernier jour. Il en est de même des témoins et des poussins normaux. Le sacrifice est fait le 30e jour. L'autopsie montre que les (A) sont en parfaite santé. Elle n'est pas faite pour les (B). Tous les ensemencements et toutes les préparations contiennent du Grötenfeld en culture pure.

Poids respectifs au 30e jour.

(A). N° 1 = 81 gr.	(B). N° 1 105 gr.	(C). N° 1 = 95 gr.
N° 2 = 113 gr.	N° 2 104 gr.	N° 2 = 83 gr.
N° 3 105 gr.	N° 3 90 gr.	N° 3 = 103 gr.
N° 4 = 79 gr.	N° 4 68 gr.	N° 4 = 82 gr.
		N° 5 = (mort le ?).

(Deuxième série). — *Expérience du* 15 *août* 1910 (œufs de Houdan). — Coli commune d'Escherich.

(A). 3 œufs désinfectés : 2 poussins (appareil).
(B). 3 œufs désinfectés : 3 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 4 œufs non désinfectés : 4 poussins (éleveuse normale).

Les poulets de l'appareil sont en très bon état jusqu'au 10e jour, où ils ont à souffrir pendant quelques heures d'une mauvaise circulation d'air dans l'appareil. Cet accident n'a pour eux aucune suite fâcheuse.

La contamination a lieu vers le 25e jour de la vie stérile. L'aspect des colonies apparues sur la gélose contrôle et l'odeur caractéristique de l'air entraîné par l'eau de la trompe nous font penser à du coli. En deux jours les poulets ont changé d'allure, ils ont presque constamment l'air souffreteux, et il en est ainsi jusqu'à la fin de l'expérience que nous poursuivons jusqu'au 60e jour. Leur développement semble s'être arrêté le 27e jour. A l'autopsie, nous ne relevons aucune lésion organique, mais seulement de l'hypérémie de tout l'intestin, des poumons et du foie; le sang du cœur ne contient pas de microbes. Le contenu intestinal et toutes les prises mis en milieu de culture donnent de très nombreuses colonies d'un coli que nous identifions au *coli commune d'Escherich.*

Poids respectifs au 60e jour.

(A). N° 1 = 62 gr.	(B). N° 1 = 120 gr.	(C). N° 1 = 130 gr.
N° 2 = 75 gr.	N° 2 = 95 gr.	N° 2 = 165 gr.
	N° 3 = 102 gr.	N° 3 = 172 gr.
		N° 4 = 163 gr.

Observation. — Ce coli que nous avons ingéré (mélangé à du cacao cuit à l'eau) à la dose de 100 centimètres cubes de culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin n'a en rien modifié notre bon état de santé. Donné aux mêmes doses à deux chiens adultes pendant deux jours de suite, il n'a provoqué chez eux aucun malaise. Il en a été de même chez les poulets (B) et (C) dont les aliments ont été arrosés de cultures du 69e au 80e jour. Peut-être des poussins de 20 jours élevés normalement en auraient-ils souffert; toujours est-il que ce coli reconnu comme n'étant pas particulièrement pathogène, le fut très net-

tement pour nos élèves stériles, soit que leur organisme eût acquis une sensibilité spéciale, — ce que nos élevages stériles semblent contredire, — soit que son pouvoir pathogène fût annihilé chez le poulet normal par la présence d'autres bactéries. Il est à remarquer que, dans notre expérience du 21 juillet 1908, un coli en symbiose avec un mesentericus n'a ni entravé ni favorisé le développement de poussins ayant été stériles.

Nous attirons l'attention sur les observations que nous venons de relater, parce qu'elles sont en contradiction avec les résultats que nous-même avons vu obtenir dans les expériences du professeur Schottelius. Ce désaccord est-il dû à ce que notre coli était très éloigné de la variété « gallinarum » employé de préférence par ce savant? Le fait que nous signalons est-il une exception? — Il ne peut de toute manière infirmer à lui seul la série des nombreuses observations de Schottelius.

Expérience du 24 *janvier* 1911 (œufs de Houdan). — Subtilis.

(A). 3 œufs désinfectés : 1 poussin (appareil).
(B). 3 œufs désinfectés : 3 poussins (éleveuse des témoins).
(C). 4 œufs non désinfectés : 3 poussins (éleveuse normale).

Deux œufs mal placés dans la mère de l'appareil n'éclosent pas.

Les 2 premiers jours après l'éclosion, le (A) n'est pas vigoureux. Il le devient rapidement ensuite et se porte très bien jusqu'au 22 février, le 28e jour. Le 23 février, la grande ouverture est ouverte afin de redresser, à l'aide d'une pince, la boîte de gélose fortement inclinée. Malgré les précautions prises, l'appareil est contaminé pendant l'opération, car 3 jours après apparaissent sur la gélose de très petites colonies cristallines. Le 20 février, l'air aspiré dans l'appareil dégage une odeur de graines sures. Le 22, l'animal change brusquement d'aspect : ses pattes sont presque ankylosées, ses ailes sont tombantes; le lendemain, ses plumes se hérissent, il est mourant. Nous le sacrifions le même jour. Les poumons sont rétractés, la plèvre et le péritoine contiennent une sérosité transparente, filamenteuse. Les bronches et tout le tube digestif sont tapissés de spores et de bâtonnets. Il en est de même des graines répandues sur le sol.

Tous les ensemencements donnent un *aérobie strict*, du subtilis, nettement différencié d'un mesentericus.

Poids respectifs au 28e jour.

(A). N° 1 = 53 gr.	(B). N° 1 = 61 gr.	(C). N° 1 = 66 gr.
	N° 2 = 65 gr.	N° 2 = 71 gr.
	N° 3 = (retiré le ?).	N° 3 = (retiré le ?).

Observation. — Le subtilis, reconnu comme un saprophyte non pathogène, a eu manifestement sur le poussin stérile des effets rapidement toxiques. Nous ne croyons pas cependant devoir les attribuer à une sensibilité particulière du sujet, mais aux produits de la décomposition opérée sur les graines par les cultures, ou bien au véritabte tapissage exceptionnel fait par ces cultures dans la trachée et les grosses bronches de l'animal.

Tableau résumé des moyennes des poids. — Ce tableau nous montre que, parmi les élevages stériles, deux expériences (12e jour et 35e jour) donnent pour les poussins de l'appareil (A) comparés à leurs témoins (B) une différence de poids insignifiante, l'une en moins, l'autre en plus. En raison des écarts de poids parfois assez sensibles constatés normalement entre les poussins d'une couvée, même de race pure, on peut considérer ces 2 élevages comme équivalents.

Restent 3 élevages stériles (15e jour, 20e jour, 45e jour), d'un poids nettement plus fort que celui des élevages témoins, et 3 autres (22e jour, 33e jour, 40e jour), d'un poids nettement plus faible. L'état d'infériorité manifeste dans lequel ont été mis nos élèves stériles dans 2 de ces derniers élevages (manque d'eau pour celui de 22 jours, manque d'air pour celui de 40 jours), fait pencher la balance en faveur du poids des élèves stériles.

D'après le tableau, on voit que ce « meilleur poids » ne se rapporte pas seulement à des poussins d'un même âge donné, mais qu'il se retrouve à diverses périodes de leur croissance, 15e, 20e, 35e, 45e jour.

RÉSUMÉ DES EXPÉRIENCES

Tableau comparatif des moyennes de poids.

Élevages stériles.

22 juin 1907, œufs de Forêt-Noire . . type 1re série : au 12e j. (A) pèsent $\frac{1}{22}$ (2 gr. ») — que (B) et (B) $\frac{1}{3,5}$ (18 gr. 8) — que (C)

21 juillet 1908, œufs Faverolles. . . . type 1re série : au 15e j. (A) pèsent $\frac{1}{12}$ (5 gr. 3) + que (B) et (B) $\frac{1}{16}$ (4 gr. 2) + que (C)

12 mai 1908, œufs Faverolles. . . . . type 1re série : au 20e j. (A) pèsent $\frac{1}{5}$ (21 gr. ») + que (B) et (B) $\frac{1}{10.4}$ (9 gr. ») — que (C)

17 avril 1911 (*) œufs Houdan. . . . . type 2e série : au 22e j. (A) pèsent $\frac{1}{8}$ (8 gr. 2) — que (B) et (B) $\frac{1}{11}$ (6 gr. 5) — que (C)

24 octobre 1909, œufs Faverolles. . . type 2e série : au 33e j. (A) pèsent $\frac{1}{5,6}$ (19 gr. ») — que (B) et (B) $\frac{1}{7}$ (17 gr. ») — que (C)

5 mars 1911, œufs Houdan . . . . . type 2e série : au 35e j. (A) pèsent $\frac{1}{19}$ (3 gr. 5) + que (B) et (B) $\frac{1}{3,8}$ (23 gr. ») — que (C)

10 juin 1910 (**), œufs ? (pas noté) . . type 2e série : au 40e j. (A) pèsent $\frac{1}{1,5}$ (86 gr. ») — que (B) et (B) $\frac{1}{7,4}$ (21 gr. ») — que (C)

7 juin 1911 Houdan . . . . type 2e série : au 45e j. (A) pèsent $\frac{1}{8.8}$ (7 gr. 5) + que (B) et (B) $\frac{1}{3,1}$ (27 gr. 1) — que (C)

(*) Manque d'eau de boisson dans l'appareil. — (**) Manque d'air dans l'appareil.

Élevages en cultures pures.

21 juil. 1908, F (*), 1re s., mésent. coli b., (15 j. stér.) au 25e j. (A) pèsent $\frac{1}{8.5}$ (8 gr. 5) — que (B) et (B) ? que (C)

28 juin 1909, H (**), 1re s., Grötenfeld . . . (18 j. stér.) au 30e j. (A) pèsent $\frac{1}{33,7}$ (2 gr. 8) + que (B) et (B) $\frac{1}{91}$ (1 gr. ») + que (C)

24 janv. 1911, H, 2e s., subtilis. . . . . (20 j. stér.) au 30e j. (A) pèsent $\frac{1}{6,3}$ (10 gr. ») — que (B) et (B) $\frac{1}{12,5}$ (5 gr. 4) — que (C)

15 août 1910. H, 2e s., coli . . . . (25 j. stér.) au 60e j. (A) pèsent $\frac{1}{3}$ (33 gr. 8) — que (B) et (B) $\frac{1}{2,8}$ (55 gr. 2) — que (C)

(*) Faverolles. — (**) Houdan.

La comparaison faite entre les témoins et les élèves normaux établit que l'appareil à élevages stériles permet de réaliser de très bonnes conditions d'expérience (type de la 1re série); en outre, elle nous permet d'apprécier dans quelle proportion sensible une de ces conditions expérimentales est modifiée défavorablement — sans entraver l'expérience, comme on le voit — par la suppression de l'alimentation journalière et par sa stérilisation en bloc à 118 degrés pendant 1 h. 30 (type de la 2e série).

A en juger par la moyenne de poids des élevages en cultures pures, la présence du streptocoque de Grötenfeld semblerait influencer favorablement le développement du poussin stérile; celle du coli en symbiose avec le mesentericus fuscus serait plutôt défavorable; le coli seul gênerait considérablement ce développement qui serait enfin rendu impossible par la présence d'abondantes cultures de subtilis.

Observations générales faites en cours d'expérience. — A côté des expériences que nous venons de relater ici, d'autres, que nous n'avons pas mentionnées, ont été interrompues accidentellement. Ces dernières, nombreuses, nous ont permis souvent, tout aussi bien que les premières, d'observer attentivement la vie du poulet élevé sans microbe. Elle nous a paru en tous points, sauf en un seul, semblable à celle des témoins; et il en est ainsi à tous les stades de leur développement observés par nous. La seule restriction porte sur la fonction digestive; l'appétit des stériles est plus développé que celui des témoins, ses déjections sont plus fréquentes et plus abondantes. Chez les uns et les autres, même turbulence, même attitude; même développement des pattes, des ongles, du bec et des plumes; même état organique, révélée par l'autopsie. Si le poussin stérile paraît à un moment plus volumineux, c'est, semble-t-il, parce que n'ayant jamais la peau irritée par des poussières septiques, il se gratte moins souvent et conserve ainsi son duvet plus longtemps. Contrairement à un fait signalé par Schottelius, nous n'avons pas vu, dans les cas d'éclosion normale et en dehors d'un mauvais fonctionnement accidentel de l'appareil, d'animaux cachectiques ni dès le 10e jour ni plus tard. Nous avons cependant constaté, à partir du 32e jour chez les stériles, et

chez leurs témoins, de race Faverolles, de la raideur articulaire des pattes, due vraisemblablement à l'exiguïté de l'appareil et de l'éleveuse des témoins.

Nous ne voulons pas dire cependant que tous nos poulets stériles soient des animaux extrêmement robustes; ils sont simplement *au moins aussi robustes que leurs témoins*, ce qui seul importe dans les déductions à tirer de l'expérience. En effet, si les stériles et les témoins de la 1re série étaient aussi développés que les élèves normaux, — ce qui confirme l'observation de Belonowsky (1) sur l'alimentation stérilisée donnée dans des conditions favorables, — il n'en est plus de même dans la 2e série où élèves stériles et témoins sont, malgré leur allure souvent très vivace, des animaux de taille plus petite, aux plumes moins poussées que chez les normaux, et reconnus à l'autopsie comme étant plus ou moins anémiés.

Le poulet stérile offre une très grande résistance à la mort par le froid, l'humidité, la soif, la faim. Chacun sait que rien n'est fragile comme la vie d'un poussin ordinaire; elle est à la merci d'une ondée, d'une privation; les poussins stériles de notre 1re expérience ont pu rester impunément pendant 12 jours, les plumes constamment mouillées et collées au corps; d'autres, dont un signalé dans notre expérience du 17-3-11, ont mis plus de 5 jours à mourir de faim, de soif et de froid. C'est là une preuve du rôle actif de l'infection s'attaquant au poulet normal dont la résistance vient d'être amoindrie par une cause physique.

Tous les animaux rendus à la vie normale, après une existence aseptique plus ou moins longue, sont devenus des adultes bien constitués.

Conlusions.

La vie sans microbe est possible pour un vertébré — le poulet — pourvu normalement d'une riche flore microbienne.

Cette vie aseptique n'entraîne par elle-même aucune déchéance de l'organisme.

Telles sont les conclusions qui se dégagent de la lecture du

(1) *Centralbl. f. Bakter.*, I., Origin., 1907, t. XLIV, p. 322.

tableau de la moyenne des poids en même temps que des observations générales recueillies en cours d'expérience.

Nos sujets stériles ont en effet dépassé victorieusement les premières semaines critiques pendant lesquelles on supposait que les sécrétions digestives du jeune animal n'étaient pas suffisantes pour qu'il pût se passer du secours des bactéries; ceux de 15 jours sont aussi « bien venus » que ceux de 6 semaines et réciproquement.

En nous donnant la preuve que leurs fonctions digestives pouvaient pourvoir à leur développement sans l'aide microbienne, ils ont confirmé du même coup que cette aide était effective chez le poulet ordinaire, ce que l'expérience n'avait pas encore établi; ne voyons-nous pas en effet que les digestions du poulet aseptique sont plus chargées en déchets alimentaires et que ce poulet supplée de lui-même à cette digestion moins complète en ingérant une quantité plus grande d'aliments? On peut donc dire que la flore intestinale, *utilisée* par l'animal, ne lui est pas *indispensable*.

La vie aseptique, plus ou moins prolongée, n'a fait subir aucune déchéance au sujet en expérience puisqu'il est au moins aussi développé que ses témoins et que, rendu à l'infection microbienne normale, il ne souffre pas de la présence des innombrables bactéries, saprophytes et pathogènes, qui, en moins de 24 heures, ont envahi son tube digestif. Il grandit, devient adulte, fait souche normale. Ce fait expérimental semble démontrer que la préparation à la lutte contre ces microbes n'est pas le résultat d'une acquisition individuelle, mais est bien héréditaire.

Les états cachectiques provoqués par le coli et le subtilis, dans les élevages en cultures pures, semblent mettre hors de cause une hypersensibilité du poussin stérile et faire entrer en jeu une action particulière exercée sur l'organisme par une bactérie mise à l'écart de toute autre influence microbienne.

Les diverses constatations qui précèdent, faites sur le poulet, se rapportent-elles à une loi générale s'étendant à tout le règne animal?

Le fait, déjà établi par l'expérience de laboratoire et l'observation puisée dans la nature pour les invertébrés, paraît se confirmer pour les vertébrés en général depuis que, pour-

suivant la série de ses recherches, Metchnikoff, en collaboration avec quatre de ses élèves (1), a fait connaître la vie normale presque aseptique d'un petit mammifère, le *Pteropus medius*, communément appelé la roussette.

De même que nos poulets stériles, la roussette rejette en excès des parcelles alimentaires non digérées et une nourriture plus abondante lui est nécessaire. Son étude a permis d'éclaircir plusieurs questions très discutées, telles que celle de la transformation de la cellulose par l'organisme et celle de l'origine microbienne des poisons phénoliques urinaires.

Bien d'autres problèmes concernant la digestion et l'immunité deviendront solubles à leur tour quand l'expérience de laboratoire pourra utiliser sans grande difficulté comme animaux aseptiques de petits mammifères tels que le chat, le cobaye, le rat ou le lapin.

Ainsi, le principe d'adaptation indissoluble entre l'animal et ses bactéries, principe qui semblait s'imposer à nous comme une loi biologique bien établie, n'est pas d'accord cette fois avec l'expérience. Nous venons de voir que les microbes — à l'aide desquels la matière vivante se perpétue dans la nature — ne sont pas indispensables à certains vertébrés *en eux*; et cette constatation, jointe à ce que nous savons de la roussette, peut déjà nous guider dans la conduite que nous avons à tenir vis-à-vis du monde microbien peuplant notre tube digestif.

(1) Metchnikoff, Weinberg, Pozerski, Distaso et Berthelot, Roussettes et microbes, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, décembre 1909.

LA DESTRUCTION INTRASPLÉNIQUE ET INTRAHÉPATIQUE DE CORPUSCULES ROUGES DU SANG

DANS LES CONDITIONS NORMALES ET PATHOLOGIQUES

par le Dr I.-I. LINTVAREV
Prosecteur à l'hôpital Alexandre, à Saratov.

(Suite et fin.)

Dans toutes les affections que nous venons de passer en revue, maladie de Banti, cirrhoses du foie, splénomégalie de Gaucher, on trouve une anémie susceptible d'expliquer la pathogénie de ces états morbides. Ce sont des anémies primitives par suractivité des érythrophages et qui se traduisent par des altérations qualitatives et quantitatives plus ou moins accusées du sang, ne différant des anémies dites pernicieuses que par une moindre intensité des modifications dans la composition sanguine.

Dans l'anémie pernicieuse, comme dans les maladies précitées (anémie de Banti, cirrhose du foie et splénomégalie), les modifications qualitatives de la composition du sang sont essentiellement les mêmes : apparition de formes jeunes, incomplètement développées d'érythrocytes (Jugendformen des auteurs allemands), telles que polychromatophiles (Grawitz, *loc. cit.*, p. 120), éléments nucléés (érythroblastes), mégalocytes et microcytes (Hayem, Eichhorst, Eisenlohr) (*). En ce qui concerne les poikilocytes, reste encore ouverte la question de savoir s'il faut les compter pour des formes dégénératives ou s'ils peuvent être rangés aussi dans le groupe des éléments irrégulièrement développés lors d'une néoformation forcée d'érythrocytes. En tout cas, il n'existe pas dans la littérature médicale de preuves concluantes de ce que les poikilocytes soient des formes dégénérées.

(*) Voy. Grawitz, *loc. cit.*

D'ailleurs, leur nombre est généralement des plus restreints dans les cirrhoses du foie, dans la maladie de Banti et dans la splénomégalie, et, d'autre part, les formes granulées ne se rencontrent que dans les anémies pernicieuses les plus graves.

Cela étant établi, les modifications du sang dans l'anémie pernicieuse ne se distinguent de celles des trois affections susmentionnées que par le degré d'altération des globules rouges et surtout par le nombre de ces globules et par leur teneur en hémoglobine.

Mais, dans l'anémie pernicieuse, l'augmentation du volume de la rate est, comme on sait, chose presque constante; il y a une splénomégalie qui, d'après les auteurs, proviendrait d'une hyperplasie de tous les éléments figurés du tissu splénique. Je n'ai pu trouver nulle part d'étude plus complète de la rate dans cette forme d'anémie. Cependant, dans quelques cas d'anémie pernicieuse dont il m'a été donné de faire l'autopsie, la rate était très augmentée de volume. Les travaux de Heinz (18) et nos recherches personnelles sur les altérations du tissu splénique dans l'anémie pernicieuse provoquée par des substances toxiques, permettent de supposer que, dans l'anémie pernicieuse chez l'homme, il y a dans la rate, par l'effet d'une substance toxique, formation excessive d'érythrophages qui absorbent en masse les globules rouges du sang.

Les recueils scientifiques sont également pauvres en renseignements sur les modifications du foie dans les anémies pernicieuses. On sait seulement — ce qui nous importe surtout — par les travaux de Quincke que, dans toute anémie pernicieuse plastique, la teneur du foie en fer est très augmentée. Ainsi, chez l'homme sain, la quantité de ce métal pour 100 grammes de substance hépatique desséchée est de 100 à 200 milligrammes, tandis que dans l'anémie pernicieuse elle atteint 1.900 milligrammes. Cette énorme teneur du foie en fer est l'indice d'une destruction considérable de globules rouges. Pareille destruction ne se produit pas, sans doute, dans le liquide sanguin lui-même, mais elle résulte, comme nous en sommes convaincu, d'une absorption excessive d'éléments figurés du sang par les érythrophages de la rate et de leur destruction dans le foie. Nous en avons décrit le mécanisme.

La génération des globules rouges destinés à remplacer

ceux qui ont été détruits se fait, comme dans toute anémie, au sein de la moelle osseuse qui est toujours rouge dans l'anémie pernicieuse. L'anémie dite aplasique fait seule exception à cette règle, mais en pareille occurence, alors qu'il s'agit, par exemple, d'un néoplasme de la moelle osseuse, l'anémie est due à l'abolissement de la fonction hématopoiétique de cet organe. Et il faut remarquer que, dans ce cas, il n'y a pas de sidérose du foie (Leube, 19). Les altérations du tube gastro-intestinal dans l'anémie pernicieuse, comme, d'ailleurs, dans toutes les maladies précitées, sont constantes et se traduisent par des phénomènes plus ou moins accusés de gastro-entérite.

Nous pouvons donc affirmer que, dans la maladie de Banti, de même que dans les cirrhoses du foie, dans la splénomégalie et dans l'anémie pernicieuse, on trouve constamment les altérations morbides suivantes :

1° Anémie qualitative et quantitative ;

2° Augmentation du volume de la rate ;

3° Altérations du foie ; sidérose ou cirrhose ;

4° Lésions atrophiques du tube gastro-intestinal ;

5° Moelle osseuse rouge.

Toutes les affections ci-dessus énumérées sont à classer dans un même groupe d'anémies primitives. Les particularités cliniques de chacune de ces formes résultent de la prédominance d'un ou plusieurs des signes que nous avons indiqués et qui fixent surtout l'attention du clinicien.

Lorsque prédominent les altérations graves du sang, on parle d'anémie pernicieuse, attribuant aux autres symptômes le rôle de phénomènes concomitants. Est-on surtout frappé par les symptômes liés à l'induration du foie, on dit « cirrhose ». En présence d'une hypertrophie de la rate, dont les causes ne sont pas apparentes, on dit « splénomégalie ». Enfin, on diagnostique la maladie de Banti lorsqu'on a affaire au syndrome ; anémie, splénomégalie et cirrhose du foie.

Or, la différence entre ces trois formes morbides n'est que qualitative.

L'érythrémie ou polyglobulie de Vaquez, accompagnée d'augmentation du nombre de globules rouges, doit aussi être classée dans ce groupe de maladies du sang, si étrange que cela puisse paraître.

On sait que la polyglobulie va de pair avec la splénomégalie, l'augmentation du volume du foie et l'hyperplasie de la moelle osseuse. Au point de vue anatomo-pathologique, cette maladie — dont nous avons eu l'occasion d'étudier cliniquement deux cas — est encore peu ou point connue, mais on peut supposer que l'augmentation du volume de la rate y est due à une destruction excessive de globules rouges, tout autre cause de splénomégalie faisant ici défaut. Comme le montrèrent mes recherches sur la maladie de Banti, ainsi que les faits constatés par Donitz (20), on peut admettre, avec grande probabilité, une destruction intrasplénique massive d'érythrocytes dans l'érythrémie également. En effet, ce processus se manifeste ici (comme c'était le cas dans mon observation) par la présence de formes jeunes de globules rouges dans le sang et d'urobiline dans le liquide urinaire. Dès lors, il est facile d'expliquer l'augmentation du volume du foie où se détruisent précisément les cellules venues de la rate et ayant happé des globules rouges.

Mais comme on a affaire ici non à une diminution, mais, au contraire, à une augmentation du nombre de globules rouges, il faut admettre que l'élaboration de ces éléments par les organes hématopoiétiques est également augmentée. En effet, la moelle osseuse est rouge dans la polyglobulie. Or, pour avoir une augmentation du nombre de globules rouges dans un volume donné de sang, pendant que, d'un autre côté, les érythrocytes sont détruits en masse, leur formation doit être singulièrement activée, et, s'il n'y a pas équilibre entre ces deux processus contraires, si la formation prédomine sur la destruction, il y aura nécessairement polycytémie.

Il existe actuellement deux explications différentes de cet état morbide. D'après certains auteurs, l'augmentation du nombre de globules rouges est l'effet de leur surproduction, leur destruction demeurant normale. Pour d'autres, l'érythrémie pourrait être due à une destruction ralentie d'érythrocytes formés en quantité normale. En ce qui nous concerne, nous ne pouvons accepter ni l'une ni l'autre de ces interprétations. Elles ne nous donnent pas, en effet, la cause de la splénomégalie qui est, pourtant, constante dans cette maladie.

Il faut nous arrêter encore sur une affection particulière, appelée pseudo-leucémie.

Nos notions sur cette maladie sont si vagues que Virchow était porté à n'y voir qu'un « fouilli » (Mischmasch). Les signes cardinaux de pseudo-leucémie ou maladie de Hodgkin sont : anémie quantitative et, en partie, qualitative; splénomégalie; tuméfaction des ganglions lymphatiques périphériques et hyperplasie de la moelle osseuse. Ces symptômes s'accompagnent d'élévation du degré thermique, laquelle est irrégulière, comme dans toute anémie primitive. La différence essentielle de cette maladie d'avec les états anémiques dont il a été question, consiste en la présence de ganglions lymphatiques tuméfiés. La littérature médicale ne renseigne pas sur la question de savoir si les ganglions sont augmentés dans l'anémie pernicieuse et dans la cirrhose du foie. Cependant, comme il a été dit, Schlagenhaufer a constaté, dans les ganglions lymphatiques hyperplasiés de splénomégaliques, la présence de grosses cellules avec vacuolisation en rayons de miel. Elles sont si caractéristiques et ressemblent tant à nos érythrophages que nous ne doutons pas un instant de leur identité avec ces derniers. Chacun peut facilement s'en convaincre en jetant un coup d'œil sur le dessein du professeur Schlagenhaufer (fig. 8).

Nous retrouvons donc dans les ganglions lymphatiques des splénomégaliques le même processus d'absorption de globules rouges par les érythrophages, et il est facile d'expliquer ce phénomène, si l'on admet que la cause qui incite les érythrophages à se multiplier dans la rate, agit de même façon sur les éléments des ganglions lymphatiques où les érythrophages se forment également. Cela n'a rien d'invraisemblable, puisque les ganglions lymphatiques ont, dans leur structure, tant d'analogie avec la rate, notamment avec ses corpuscules de Malpighi. Si donc les éléments cellulaires des corpuscules de Malpighi engendrent des érythrophages sous l'influence d'un poison circulant dans le sang (voir plus haut), pourquoi les ganglions lymphatiques ne le feraient-ils pas aussi dans des conditions analogues?

Dans notre observation de maladie de Banti, nous avons noté une hyperplasie des plus manifestes des ganglions mésentériques. Suivant toute probabilité, nous y eussions trouvé des

érythrophages, mais, en faisant l'autopsie, nous ne pensâmes pas à conserver ces glandes pour l'examen microscopique, ce que nous regrettons beaucoup.

Cependant, il faut en convenir, si dans la littérature médicale il n'est pas fait mention de ces phénomènes, ni dans l'anémie pernicieuse, ni dans la cirrhose du foie, il ne s'ensuit pas que ces altérations ne puissent exister en réalité. Quant à moi, je suis enclin à penser que les altérations décrites par le professeur Schlagenhaufer dans les splénomégalies doivent exister également dans les anémies primitives.

Par contre, nous savons, par les travaux de Sternberg (20), que les ganglions pseudo-leucémiques contiennent nombre de cellules *sui generis*, mononucléées ou polynucléées, avec protoplasma abondant, à noyau volumineux, rond et polymorphe, se colorant facilement. Ces cellules rappellent celles des néoplasmes. On trouve des formes de transition entre elles et les cellules endothéliales des capillaires. Renferment-elles des globules rouges ou des « vacuoles en rayons de miel »? L'auteur ne nous le dit pas.

D'après les recherches les plus récentes (V. Bleichrœder, *loc. cit.*, p. 476), on admet, dans la pseudo-leucémie, comme substratum anatomique de cette affection, trois sortes de modifications des ganglions lymphatiques, se distinguant entre elles histologiquement et étiologiquement, à savoir :

1° Simple hyperplasie : lymphome simple;

2° Hyperplasie tuberculeuse : lymphome tuberculeux, et

3° Hyperplasie de la syphilis tertiaire : lymphome gommeux.

Sternberg a trouvé ces cellules dans les lymphomes tuberculeux, Lœwenbach (22) dans les lymphomes syphilitiques. Ils les décrivent comme offrant une grande ressemblance avec les cellules endothéliales et épithéliales. Elles sont, d'après Sternberg, volumineuses, à protoplasma finement granulé, mais cet auteur ne parle pas de leurs inclusions. On pourra les trouver, très probablement, dans les hyperplasies simples (si elles existent) des ganglions pseudo-leucémiques, et il est permis de supposer que ces cellules sont pareilles à celles que Schlagenhaufer constata dans les ganglions lymphatiques de sujets atteints de splénomégalie.

Dans la plupart des cas de pseudo-leucémie, la rate est grosse, de consistance moyenne, et elle présente des signes non douteux d'hyperplasie : augmentation du nombre de corpuscules de Malpighi et prolifération des éléments de la pulpe. D'après Bleichrœder (*loc. cit.*, p. 447 et 448), la rate offre des altérations similaires dans la cirrhose du foie, dans l'anémie pernicieuse et autres maladies du sang où cet organe accuse une augmentation de la teneur en fer, indice de destruction excessive des globules rouges. On y trouve de grosses cellules particulières (formes irritatives, Beinzungsformen de Turck) et une prolifération, d'intensité variable, du stroma conjonctif. D'après Ziegler (*loc. cit.*, p. 129 à 131), on observe, dans la pseudo-leucémie, une splénomégalie d'origine tuberculeuse. Parfois, elle est accompagnée d'une dégénérescence caséeuse peu apparente, caractérisée par la formation de nodules à grosses cellules, sorte de prolifération d'éléments polynucléés. En admettant, dit l'auteur, que cette splénomégalie tuberculeuse fût liée à des lésions analogues des ganglions lymphatiques, on pourrait expliquer le tableau clinique et anatomique de la pseudo-leucémie.

Il est donc permis de supposer — et nous pûmes nous en convaincre par l'examen de rates de tuberculeux — que l'anémie quantitative des pseudo-leucémiques est produite également par l'augmentation du nombre des érythrophages dans la rate.

Comme le fait a déjà été signalé, la pseudo-leucémie accompagne, dans la plupart des cas, la tuberculose que C. Sternberg (*loc. cit.*) a constaté quinze fois sur dix-huit observations de pseudo-leucémiques. D'autres ont souvent trouvé des bacilles tuberculeux dans les ganglions de ces malades, soit à l'examen purement bactérioscopique (Askanazy, 23) soit, le plus souvent, après inoculations aux animaux du suc de ces ganglions, alors même que ceux-ci ne présentaient pas de lésions microscopiques propres au processus tuberculeux (Fischer, 24, et Sabrazès, 15).

La présence, dans les ganglions pseudo-leucémiques, d'érythrophages dont les dimensions, la forme et le protoplasma varient suivant leurs inclusions, pourrait peut-être, fournir au professeur Ziegler l'explication de l'origine des « lym-

phomes, polymorpho-cellulaires », forme particulière de lésions tuberculeuses dans les ganglions pseudo-leucémiques (*loc. cit.*, p. 149).

Pour ce qui en est de l'état du foie dans la pseudo-leucémie, nous n'en savons encore rien, mais, du moment que les érythrophages sont nombreux dans la rate — comme nous n'en doutons pas — on doit évidemment en trouver aussi dans le foie, où, apportés par le torrent circulatoire, ils se détruisent, fournisssant en abondance le matériel nécessaire à l'élaboration de la bile et à la production de dépôts d'hémosidérine et amenant, dans certains cas, des lésions interstitielles.

De cette façon, entre la pseudo-leucémie et les maladies précitées (anémie de Banti), splénomégalie primitive, cirrhose du foie, anémie pernicieuse d'une part, et la tuberculose ou la syphilis d'autre part, il existe un lien intime. Dans toutes ces affections, l'anémie est due à certaines substances toxiques produisant dans la rate, dans les ganglions lymphatiques, et peut-être aussi dans la moelle osseuse, une augmentation considérable en éléments phagocytaires préexistant à l'état normal, qui happent les globules rouges du sang et les portent avec le torrent circulatoire au foie, pour y subir une destruction définitive?

Quels sont ces poisons?

Pour essayer de résoudre cette question, nous avons mis à profit les données de l'hématopathologie.

D'après Gravitz (*loc. cit.*, p. 232 à 233), il y a deux sortes de poisons du sang qui produisent l'anémie.

Les premiers, une fois introduits dans l'organisme, détruisent les globules rouges dans le sang circulant. Ce sont les poisons dits hémocytolytiques.

Les poisons du second groupe exerceraient une action dite plasmotrope : sans altérer les globules rouges de la circulation générale, ils leur conféreraient la propriété de se détruire dès qu'ils auront pénétré dans la rate ou dans le foie. A ce groupe appartiendraient la phényl-hydrasine et ses dérivés : pyrodine ou acétyl-phényl-hydrasine (hydracétine), l'acide acétylopropionique (antithermine ou antiorthine), etc.

Mais expliquer l'action de ces poisons par leur « plasmotropisme » nous paraît assez étrange. Comment, en effet, com-

prendre que, à dose active, ils n'influenceraient les érythrocytes que dans la rate et le foie et non ailleurs? Déjà dans le travail de Heinz (*loc. cit.*), qui a établi précisément la théorie de l'action « plasmotrope » de ces poisons, on peut trouver des indications, de nature à laisser supposer que les choses se passent, en réalité, autrement que ne le pense l'auteur. Heinz fait ressortir que, dans les vaisseaux hépatiques, sous l'influence de la phényl-hydrazine ou des poisons similaires, les globules rouges des vaisseaux de la rate prennent un aspect granuleux (Kœrnchenbildung), — probablement du fait d'une organisation particulière de l'endothélium vasculaire, — augmentent de densité et se transforment en pigment granuleux à l'intérieur des cellules spléniques. Et plus loin Heinz dit que ces cellules augmentent beaucoup de nombre et de volume et qu'on peut les trouver aussi bien dans les vaisseaux que dans les tissus. Elles sont remplies de produits d'altérations morphologiques et chimiques des érythrocytes inclus. On pourrait observer la dissolution progressive et la disparition de leurs noyaux. Pour Heinz, ce sont là des cellules endothéliales anormalement augmentées de volume par absorption des débris de globules rouges. Il estime que, sous l'influence du poison, il se produit primitivement une altération et une destruction d'érythrocytes, et que c'est consécutivement qu'apparaissent les « dévoreurs » de ces éléments avariés.

Mais ne serait-il pas plus simple de supposer que les poisons anémiants du second groupe, introduits dans l'organisme d'une façon répétée, excitent les érythrophages préexistant normalement dans la rate et que ces cellules, à mesure que s'accroît leur nombre, absorbent de plus en plus de globules rouges. Cette manière de voir n'est pas en contradiction avec ce que nous savons de la marche des phénomènes chimiotaxiques dont l'intensité augmente par l'introduction répétée d'éléments hétérogènes à l'organisme, qu'il s'agisse, en l'espèce, de poisons bactériens ou d'autres substances chimiques.

Nous avons répété sur le lapin les expériences de Heinz, avec la pyrosine, nous bornant à l'emploi de petites doses, afin de ne pas provoquer d'intoxication aiguë. La dose thérapeutique de cette substance, pour l'homme, étant de 0 gr. 10, nous njectâmes à un lapin, du poids d'un kilogramme et demi,

2 milligrammes et demi chaque jour, dans la veine auriculaire.

Avant l'expérience, l'animal pesait exactement 1.580 grammes ; sa température était entre 37 et 38 degrés, on comptait dans 1 centimètre cube de sang, 5.900.000 globules rouges et 5.100 leucocytes. Le taux de l'hémoglobine était à 85 p. 100 (hémoglobinomètre de Fleischl). Les érythrocytes et les leucocytes ne présentaient rien d'anormal.

Dès le quatrième jour, donc après trois injections du poison, on nota l'apparition de polychromatophiles, une certaine diminution du nombre des érythrocytes (5.780.000) et une augmentation de celui des leucocytes (5.400).

Le cinquième jour, on remarqua des formes nucléées d'érythrocytes (rares, il est vrai), à plasma chromatophile. La température était à 39 degrés et le poids du corps avait diminué jusqu'à 1.562 grammes.

Le huitième jour, la température était à 38°2, le nombre d'érythrocytes à 5.650.000. Beaucoup de cyanophiles avec ou sans noyau. Il y avait souvent des éléments dont le noyau s'échappait du protoplasma. Parfois, on trouvait aussi des noyaux complètement libres dont les dimensions et autres particularités correspondaient à ceux des érythroblastes.

Le neuvième jour, le taux de l'hémoglobine n'était que de 60 p. 100 et, dans le sang, à côté des forces constatées antérieurement, il y avait des macrocytes, quelques microcytes et ce que les auteurs allemands appellent des ombres (Schatten).

Les premiers poikilocytes furent constatés le quinzième jour ; la température variait alors entre 38 degrés et 38°5.

Enfin, le dix-septième jour, après examen hématologique, on tua le lapin par une piqûre du bulbe. Il pesait 1.670 grammes (augmentation de 90 grammes). On comptait 4.720.000 érythrocytes (diminution de 33 p. 100), 7.225 leucocytes (augmentation de 1.825) et 47 p. 100 d'hémoglobine (diminution de 33 p. 100). Plus de la moitié des éléments figurés du sang étaient des polychromatophiles nucléés ou anucléés. On apercevait quelques microcytes, beaucoup de macrocytes toujours polychromatiques, peu de poikilocytes. Jamais au cours de l'expérience on ne vit de formes granulées.

Autopsie : rate augmentée de volume, comparativement à celle d'un lapin sain de même poids ; capsule tendue, tissu de

couleur rouge foncé, pulpe flasque, s'enlève facilement par le raclage; corpuscules de Malpighi bien apparents. Foie sans altérations. La moelle osseuse des fémurs est partout rouge. La rate pèse 1 gr. 70 (le poids de la rate d'un lapin normal est de 0 gr. 78), elle mesure 5 centimètres de long sur 1 centimètre de large, son épaisseur est de 0 cent. 7. Le foie pèse 73 grammes.

A l'examen microscopique, en solution isotonique, du produit de raclage de la rate, beaucoup d'érythrophages contenant des globules rouges, pour la plupart altérés, ou leurs débris; ou bien du pigment foncé seulement. Les globules rouges ne présentaient nulle part de phénomènes de désintégration.

L'examen microscopique de coupes de rate et de foie fixées par l'acétone et par le liquide de Koultchitzki, fit voir ce qui suit :

Sinus et veines gorgés de sang. Les vaisseaux contiennent des globules rouges dont la colorabilité est variable. Pas de différence entre les monochromatophiles et les poliochromatophiles. Abondance de formes nucléées et de noyaux libres. Pas de globules granuleux ni de fragments d'érythrocytes. Beaucoup de leucocytes et de grosses cellules contenant des globules rouges nucléés et anucléés, leurs débris, du pigment foncé ou seulement des ombres de globules, parfois un leucocyte. Un spécimen d'érythrophage provenant d'un sinus de rate de lapin est représenté sur le photogrammme (fig. 9). On ne trouve que cet unique érythrophage, le reste du champ du microscope n'étant pas net. Sur les préparations, on peut suivre toutes les phases de destruction des érythrophages. On voit beaucoup de formes en voie de désintégration, les érythrophages non altérés sont assez rares: on ne les aperçoit qu'à l'intérieur des vaisseaux sanguins (sinus et veines). Ils ont un noyau assez volumineux, facilement colorable, situé quelque part à la périphérie, dans une sorte de renflement du bord protoplasmique, fortement coloré par l'éosine (Giemsa). Ils contiennent des globules rouges souvent nucléés. En dehors des vaisseaux de la rate, dans la pulpe splénique, on trouve des érythrophages à toutes les périodes de la destruction. Très grand nombre d'érythrophages dans la rate, on peut en compter 40 environ dans le champ du microscope, à un grossissement moyen.

Les corpuscules de Malpighi offrent un phénomène très intéressant. Ils sont nombreux et plus ou moins gros, par suite d'hyperplasie des éléments cellulaires. Sur le photogramme ci-joint (1), on voit une division par mitose des noyaux des cellules lymphoïdes des corpuscules de Malpighi. Nombre de cellules des corpuscules de Malpighi de la rate sont hypertrophiées et cette hypertrophie intéresse à la fois le corps cellulaire et son noyau. Ces grosses cellules sont surtout nombreuses à la périphérie du corpuscule, quelques-unes d'entre elles renferment plusieurs globules rouges encore peu altérés : ce sont les érythrophages les plus jeunes.

De cette description de l'état des éléments cellulaires des corpuscules de Malpighi de la rate d'un lapin intoxiqué chroniquement par la pyrodine, on peut conclure, avec toute évidence, *que les érythrophages proviennent des corpuscules de Malpighi de la rate*, *par voie de multiplication et d'hypertrophie des éléments lymphoïdes*, *et c'est en cela qu'il faut voir le rôle principal des corpuscules de Malpighi.*

Sur un autre microphotogramme (fig. 11), on voit trois cellules situées dans un sinus, au bord d'un corpuscule de Malpighi, dont la partie centrale est représentée sur le microphotogramme précédent. La cellule de droite a un gros noyau en mitose, la cellule moyenne est petite et contient un noyau à l'état de repos. A gauche, on voit un érythrophage ayant déjà absorbé plusieurs globules rouges qui se désagrègent.

Ainsi donc, *les corpuscules de Malpighi de la rate sont le lieu de naissanee des érythrophages*, ce que confirme aussi ce fait que la plupart des érythrophages se situent au pourtour et à proximité des corpuscules de Malpighi.

Notre manière de voir n'est nullement contredite par les faits enregistrés dans la science. Ainsi, par exemple, nous lisons dans le mémoire de Dominici (26) : « Les corpuscules de Malpighi prennent part à l'élaboration des éléments de la pulpe, lesquels, par la suite, se transforment en myélocytes et autres cellules de la pulpe. »

On obtient des tableaux très nets sur des préparations de rate, qu'on traite, avant de les colorer, par le ferro-cyanure de

(1) Voir Pl. II, n° de janvier.

potassium, puis par l'acide chlorhydrique, pour y faire ressortir l'hémosidérine.

Par cette réaction microchimique, la coupe, une fois sortie de la solution ferro-cyanique et plongée dans l'acide chlorhydrique, prend rapidement une couleur bleu foncé, car elle contient beaucoup de fer. A l'examen microscopique, les amas de fer correspondent surtout aux érythrophages. Presque tous les érythrophages d'une rate de lapin donnent avec plus ou moins d'intensité la réaction du fer; quelques-uns seulement font exception. Il s'ensuit que, dans les érythrophages de rate de lapin, le processus lié au dégagement du fer par l'hémoglobine se fait, sous l'influence de la pyrodine, d'une façon très rapide et énergique. En plus, par l'action de ce poison, du moins chez le lapin, la destruction des globules rouges dans la rate se poursuit sur une vaste échelle. En effet, avec ce procédé de traitement des préparations microscopiques, on trouve beaucoup d'érythrophages en voie de destruction à l'intérieur des sinus et des veines, et surtout parmi les éléments de la pulpe splénique.

Fait à retenir, on peut constater à l'intérieur des érythrophages des globules rouges adultes et des globules jeunes, nucléés. Il se fait donc, dans les vaisseaux de la rate, une absorption non seulement d'érythrocytes mourants ou en voie de destruction, comme le suppose Heinz (*loc. cit.*), mais de tous les éléments figurés venant en contact avec les érythrophages : éléments adultes ou jeunes et même leucocytes.

Dans les anémies dues aux maladies que nous avons passées en revue, on ne trouve guère, dans le sang de la rate, d'éléments en voie de destruction autres que les érythrophages : leurs débris, en forme d'amas de pigment, n'apparaissent dans la pulpe qu'après désintégration complète des cellules contenant des globules rouges. Même dans les conditions normales, comme nous l'avons déjà dit, les érythrophages absorbent non pas des éléments mourants, mais des éléments normaux, dès que ceux-ci viennent en contact avec leur protoplasma flasque et visqueux.

Le foie de notre lapin n'est pas altéré. Ses cellules ne se distinguent pas de celles d'un foie normal. Il en est de même du tissu de la capsule de Glisson, dans lequel il n'y a que relati-

vement peu d'érytrophages. Ceux-ci se situent à la périphérie du lobule, dans les capillaires, et donnent, tous, la réaction nette du fer. On en trouve également dans les cellules hépatiques, mais en petit nombre. Cependant, en comparant ce foie à celui d'un lapin normal, la différence apparaît nettement. Dans le foie normal, il est très difficile de déceler des érythrophages, tandis qu'on les rencontre ici dans chaque lobule, sinon dans tous les capillaires.

L'examen de la moelle osseuse montre le tableau habituel de l'hyperplasie cellulaire bien caractérisée de cet organe, accompagnée d'une augmentation de l'hématopoièse.

Donc, *l'intoxication du lapin, par introduction de petites doses de pyrodine dans le sang, amène une anémie (quantitative et qualitative) du fait de l'absorption en masse de globules rouges, non modifiés, par de grosses cellules* sui generis *dans les vaisseaux de la rate. Ce sont des érythrophages qui se détruisent avec leur contenu, et d'une façon si rapide qu'un petit nombre d'entre eux seulement pénètre dans le foie. Ces remarquables cellules sont engendrées dans les corpuscules de Malpighi de la rate, dont la prolifération est activée par le poison.*

Ainsi, sous l'influence d'une substance toxique, — de la pyrodine dans notre expérience, — la destruction des cellules qui absorbent en masse les globules rouges se fait surtout dans la rate; ce processus est beaucoup moins intense dans le foie.

Nous savons déjà qu'un dégagement excessif des produits de désintégration de globules rouges a lieu dans le foie au cours des états anémiques chez l'homme et que ce processus, effectué par l'intermédiaire des érythrophages, aboutit, dans certains cas, à la cirrhose hépatique. Si, comme on l'observe chez le lapin sous l'influence de la phényl-hydrasine, ce processus n'est que de faible intensité dans le foie, on comprend qu'on ne puisse s'attendre à voir se développer des lésions cirrhotiques, même en prolongeant l'expérience. C'est en cela, croyons-nous, qu'il faut chercher l'explication de ce fait qu'on n'arrive pas à obtenir artificiellement une cirrhose hépatique par la pyrodine ou n'importe quel autre poison, notamment par l'alcool.

Ces expériences sont à vérifier, en particulier en ce qui

concerne l'alcool, mais d'ores et déjà on peut dire que les insuccès de ceux qui expérimentèrent avec l'alcool tiennent, d'une part, à la nature même du poison employé et des procédés de son introduction et, d'autre part et surtout, à certaines particularités d'organisation des animaux en expérience, dont les érythrophages sont moins stables que ceux de l'homme. Il est également probable que les poisons qui incitent les cellules à une activité excessive exercent en même temps une très forte action sur leur protoplasma dont ils amènent la destruction rapide, de telle sorte que très peu de ces cellules parviennent au foie. Ces conditions peuvent bien engendrer la splénomégalie, mais pas la cirrhose hépatique.

Chez l'homme aussi, l'alcool ne produit pas toujours la cirrhose. Les cirrhotiques sont loin d'être aussi nombreux que les ivrognes.

Certains auteurs font ressortir le caractère primitif des lésions de la rate dans les cirrhoses du foie. Rosch (*loc. cit.*) dit : « Il résulte de nombreuses observations cliniques que les lésions de la rate précèdent celles du foie. »

Il faut donc admettre que l'alcool agit sur les tissus du foie indirectement, en y provoquant la cirrhose par l'intermédiaire des érythrophages de la rate, lesquels, sous son influence, se multiplient dans les corpuscules de Malpighi, tout en se détruisant dans la rate (qui augmente de volume) et dans le foie, où peut survenir une prolifération inflammatoire du tissu conjonctif interlobulaire, en rapport avec le nombre des érythrophages détruits. La différence entre les animaux qui n'ont jamais de cirrhose alcoolique du foie et l'homme, consiste en ce que, chez ce dernier, les érythrophages étant plus résistants à ce poison, sont transportés, avant d'être détruits, par le torrent circulatoire dans les capillaires des lobules hépatiques, tandis que les érythrophages d'animaux et ceux d'individus humains sans prédisposition à la cirrhose du foie, sont presque tous détruits dans la rate elle-même, si bien qu'une partie infime seulement d'entre eux réussit à pénétrer dans le foie où, en raison de leur petit nombre, ils ne peuvent amener de prolifération du tissu conjonctif interlobulaire.

Par rapport à la tuberculose, les animaux ne diffèrent pas essentiellement de l'homme : dans les deux cas, les érythro-

phages sont évidemment de même résistance au virus tuberculeux et ils passent dans le foie où, en se détruisant, ils déterminent une irritation du tissu conjonctif avec, parfois, phénomènes de cirrhose.

Il va sans dire qu'il faut tenir aussi compte des différences individuelles d'exemplaires de la même espèce animale, ainsi que de la quantité et de la qualité du poison.

D'après ce qui vient d'être dit, il y a lieu de penser que le nombre de poisons analogues à la pyrodine, à l'alcool et à la toxine tuberculeuse, poisons produisant de l'anémie avec altétions, d'intensité variable, de certains organes, ne saurait être restreint.

On peut, en général, admettre une action anémiante des poisons par le mécanisme de l'érythrophagie dans les cas suivants :

1° Dans nombre de maladies infectieuses (tuberculose, syphilis, lèpre, malaria, fièvre typhoïde, etc.);

2° Dans les intoxications chroniques (alcool, etc.) ;

3° Dans l'helminthiase (botriocéphale 1) ;

4° Dans les tumeurs malignes (anémie des cancéreux, mais ici c'est un phénomène inconstant) ;

5° Dans les décompositions intestinales et dans la copros tase (V. chez Grawitz, *loc. cit.*, p. 233).

Les thèses que nous venons de formuler appellent, sans doute, un contrôle rigoureux et de nouvelles recherches dans la même direction, recherches à faire dans des laboratoires bien agencés, par plusieurs expérimentateurs et dans des conditions plus favorables que celles dont il fallut me contenter. Je ne tarderai pas à y contribuer pour ma part, mais, en attendant, je voudrais énoncer quelques considérations sur ma cinquième thèse, concernant les anémies par action des produits anormaux de fermentation intestinale et les états pathologiques qui y sont liés.

Pour provoquer une cirrhose du foie, les expérimentateurs avaient recours, comme on sait, à divers poisons, surtout à l'alcool, mais ils en obtenaient toujours des résultats négatifs.

(1) Grawitz (*loc. cit.*) qualifie de « plasmotrope » le poison sécrété par ce parasite.

On sait aussi que, dans la cirrhose du foie chez l'homme, on trouve des lésions de degrés divers dans le tube digestif. Cela étant, L. d'Amato (27) se demanda si l'inflammation du tissu interstitiel du foie avec production de cirrhose n'était pas liée à une résorption de produits de décomposition du contenu intestinal. Il entreprit de nombreuses expériences sur les animaux (lapins et chiens) qu'il intoxiquait soit par les produits de putréfaction de la viande de bœuf, soit par l'acide butyrique qui se forme toujours, comme on sait, dans les décompositions intestinales.

Dans toutes ces intoxications, réalisées pendant un temps variable, parfois prolongé, l'auteur n'a jamais pu obtenir de véritable cirrhose du foie, telle qu'on l'observe chez l'homme. Tout au plus notait-il une infiltration cellulaire insignifiante, nullement comparable à la cirrhose hépatique. Par contre, il observa des lésions de la rate et du foie. Malheureusement, d'Amato n'a pas étudié les modifications du sang ni l'état de la moelle osseuse.

Pour ce qui en est des altérations de la rate, elles se manifestaient, pour la plupart, par une hyperémie très marquée et par l'abondance de pigment sanguin ; parfois, on trouvait de grosses cellules dont quelques-unes contenaient du pigment. On notait aussi une prolifération plus ou moins considérable et presque constante du tissu conjonctif avec hyperplasie des corpuscules de Malpighi. Dans un cas (9e expérience avec l'acide butyrique, p. 451), « certaines cellules lymphoïdes des corpuscules de Malpighi étaient disparues et se trouvaient remplacées par de grosses cellules mononucléées ».

Le foie présentait les lésions suivantes :

1° Infiltration cellulaire, d'intensité variable, du tissu conjonctif interlobulaire ;

2° Altérations des cellules hépatiques, intéressant les parties périphériques des lobules. Vacuolisation constante des cellules hépatiques, parfois si prononcée qu'il ne subsistait plus qu'un fin réticulum de leur protoplasma. Pas d'altérations des noyaux. Souvent les cellules se colorent mal, se détachent des trabécules et sont parfois frappées de nécrobiose. En certains points, on voit des groupes de telles cellules contenant beaucoup de pigment sanguin brun jaunâtre (p. 449) ;

3° Apparition, à la périphérie des lobules, de formations que l'auteur tient pour des amas de pigment (Pigmentklumpen). Ces formations sont représentées sur la fig. 1 de la table XIII. Ici, d'Amato reproduit nos érythrophages avec tous leurs traits caractéristiques ;

4° Hyperémie peu apparente ;

5° Parfois, thrombose des veines centrales (l'auteur ne dit pas de quel genre de thrombose il s'agit).

De cette description des lésions de la rate et du foie dans les intoxications par les produits de décomposition du contenu gastro-intestinal, il résulte que d'Amato avait affaire à une destruction excessive de globules rouges par l'intermédiaire d'érythrophages en voie de multiplication dans les corpuscules de Malpighi de la rate. En conséquence, il y avait, dans cet organe, beaucoup de pigment sanguin et splénomégalie. Les cellules vacuolisées à la périphérie des lobules hépatiques, leur nécrobiose plus ou moins accusée, leur teneur en pigment sanguin (Pigmentklumpen) et la thrombose des veinules centrales (par ces mêmes cellules, probablement, ou, plutôt, par leurs débris) : tous ces faits indiquent que l'auteur a trouvé dans le foie des érythrophages auxquels il a attribué les propriétés des cellules hépatiques pour cette raison, vraisemblablement, que, disposés le long des parois des capillaires, ils se trouvaient en contact intime avec les cellules du foie.

Dans quelques cas, il est vrai, il a vu des cellules « détachées » des travées hépatiques, mais c'étaient là, sans aucun doute, des érythrophages libres, à l'intérieur des capillaires.

Après ce travail d'Amato, si intéressant pour nous, il importait d'établir la dépendance entre l'érythrophagie excessive et la résorption des produits de fermentations anormales dans les affections du tube digestif.

Nous nous croyons donc autorisés à attribuer *une des causes les plus importantes des anémies primitives* et des lésions qu'elles produisent dans la rate et dans le foie — cirrhose hépatique ou splénomégalie, anémie pernicieuse ou syndrome de Banti — *à des troubles chroniques du tube gastro-intestinal*, accompagnant la résorption dans le sang des produits de putréfaction alimentaire, et nous pouvons, en pareil cas, recommander aux médecins de fixer leur attention sur le tube

digestif des malades atteints de l'une ou de l'autre variété de ces anémies. Rememorons-nous l'adage du clinicien expérimenté qu'était le professeur Leyden : « *Qui bene nutrit, bene medetur.* »

Les ferments lactiques du professeur Metchnikoff auront, nous en sommes convaincus, une place importante dans la thérapeutique de ces affections.

Une guérison est parfois obtenue par l'élimination du foyer principal de destruction des érythrophages, de la rate, opération que Banti fut le premier à recommander.

CONCLUSIONS

Ma communication étant terminée, je vais maintenant formuler mes thèses principales :

1° Le processus de régénération du sang s'effectue, dans les conditions normales, par l'intermédiaire de cellules spéciales, d'érytrophages, qui, dans la rate, happent les éléments figurés, notamment les globules rouges. Ces cellules sont détruites, en partie, dans la rate elle-même, mais la plupart d'entre elles sont transportées, par le torrent circulatoire, au foie où elles se détruisent définitivement, fournissant aux cellules hépatiques, pour l'élaboration de la bile, les produits de destruction intracellulaire des globules rouges. Sans ces adaptations remarquables, il serait impossible de se figurer le mécanisme de la résorption des globules rouges dans les capillaires du foie. La moelle osseuse remplace par de nouveaux érythrocytes les globules rouges détruits.

2° Dans les états pathologiques avec symptômes d'anémie primitive, l'absorption de globules rouges par les érythrophages est augmentée d'intensité.

3° La maladie de Banti, la cirrhose du foie, la splénomégalie primitive et l'anémie pernicieuse ne sont pas des maladies autochtones. Elles doivent être rangées dans un groupe commun d'anémies primitives, ne différant entre elles que quantitativement par leurs manifestations dans les divers organes. On parle d'anémie pernicieuse, si au premier plan du tableau clinique figurent les altérations du sang; de cirrhose hépatique,

lorsque prédominent les troubles liés au développement excessif du tissu conjonctif du foie; de splénomégalie, en présence d'une tuméfaction de la rate, les troubles du côté du foie et les altérations du sang étant relégués au second plan; enfin, de maladie de Banti, si tous ces symptômes cliniques sont au complet.

4° Toute cirrhose du foie résulte d'une irritation inflammatoire du tissu conjonctif de la capsule de Glisson par les produits de désintégration d'érythrophages et de leur contenu, irritation qui se localise dans les parties périphériques des lobules.

5° Dans les états anémiques, la splénomégalie dépend essentiellement d'un développement exagéré du stroma conjonctif de la rate et de son irritation par des produits résultant de la destruction de globules rouges à l'intérieur des érythrophages.

6° Le foyer d'origine des érythrophages est dans les corpuscules de Malpighi de la rate. La production excessive de ces éléments est déterminée par divers poisons, soit élaborés dans l'organisme lui-même, soit venus du dehors.

7° L'ictère dit hématogène, lors d'une destruction excessive de globules rouges par les érythrophages, s'explique fort simplement par l'osmose entre les cellules hépatiques et les érythrophages.

8° Les altérations du sang dans les anémies primitives consistent, d'une part, en une diminution du nombre total des globules rouges, du fait de leur destruction excessive, dans la rate et dans le foie, par le protoplasma des érythrophages en suractivité, et, d'autre part, en une modification dans la composition qualitative du sang, les globules rouges détruits étant remplacés par de nouveaux érythrocytes hâtivement élaborés dans la moelle osseuse. Un surcroît de besoin en globules rouges fait apparaître dans le sang des formes jeunes de ces éléments : polychromatophiles, érythroblastes, macrocytes et microcytes. Les poikilocytes appartiennent, vraisemblablement aussi, à ces formes jeunes.

9° Le poison tuberculeux provoque dans les corpuscules de Malpighi de la rate une surproduction de phagocytes pour la lutte contre l'intoxication. Ces phagocytes sont en même temps des érythrophages : ils engendrent, comme ces derniers,

l'anémie, l'augmentation du volume de la rate et les lésions cirrhotiques du foie.

10° Les poisons tuberculeux et syphilitique (quelques autres aussi) déterminent une surproduction de phagocytes (autrement dire, d'érythrophages), par prolifération excessive des éléments des corpuscules de Malpighi de la rate et des éléments analogues des ganglions lymphatiques où se produit aussi, si les conditions y sont favorables, une multiplication de ces « phagocytes à tout faire », parfois en grande quantité.

En terminant, je tiens à exprimer ma sincère gratitude au D[r] A. A. Vinogradov pour ses beaux microphotogrammes qui montrent si bien les phénomènes qu'il m'a été donné de constater.

Saratov, avril 1910.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. Quincke. — *Deutsch Archiv f. klin. Med.*; Bd XX und XXV, et *Centralblatt f. med. Wissenchaft.*, 1887, n° 47.

2. Banti. — Splenomegalie mit Lebercirrhose. *Ziegler's Beiträge zur path. Anat. u. allg. Path.*, v. XXIV, 1898.

3. Klopstock (Félix). — Ueber Milztumor, Icterus und Ascites bei Lebercirrhose. *Virch. Arch.*, v. CLXXXVII, 1907.

4. Ziegler (E.). — *Lehrbuch der speciellen pathologischen Anatomie.* Iena, 1906.

5. Silbermann. — *Berlin. klin. Wochenschrift*, 1886, p. 473.

6. Rosenstein. — Ueber chron. Leberentzundung. *Ref. f. inner. Med.*, 1892.

7. Wlajew. — Ueber einige Veränderungen des Blutes bei Erkrankungen der Leber (E. Gravitz, *loc. cit.*)

8. Gravitz. — *Klinische Pathologie des Blutes.* Leipzig, 1906.

9. Bleichroeder. — Ueber Lebercirrhose und Blutkrankheiten. *Virch. Arch.*, v. CLXXVII, 1904.

10. Borissova. — Beiträge zur Kenntniss der Bantichen Krankheit und Splenomegalie. *Virch. Arch.*, v. CLXXII, 1903.

11. Zélénev. — La chloro-anémie syphilitique (en russe). *Thèse* de Kiev.

12. Bartel et Neumann. — Lymphocyt. und Tuberkulbacillen. *Zentralblatt f. Bacter.*, v. XL, fasc. 4, 1905.

13. Mouisset et Bonnamour. — Du foie des tuberculeux. *Rev. de méd.*, v. XXIV, 1904.

14. Nikiforoff. — Phagocytenkampf bei Rückfalltyphus. *Beiträge v. Ziegler*, v. XII, 1892.

15. Roche. — Relations du foie et de la rate en pathologie, XI[e] *Congrès français de Médecine*, Paris, 13-15 octobre 1910.

16. Gaucher. Splénomégalie primitive. *Thèse* de Paris, 1882.

17. SCHLAGENHAUFER FRIEDRICH, Wien. — Ueber meist familiar vorkommende histologisch charakteristische Splenomegalien (Typus Gaucher). *Virch. Arch.*, v. CLXXXVII, 1907.

18. HEINZ (R.). — Ueber Blutdegeneration und Regeneration. *Zieglers Beiträge*, v. XXIX, 1901.

19. LEUBE (W.). — Ueber ein Fall von rapid verlaufene oder schwerer Anaemie mit gleichzeitiger leukaemischer Beschaffenheit des Blutes (Gravitz, *loc. cit.*, S. 322).

20. DONITZ (W.). — *Deutsche Klinik*, v. I.

21. STERNBERG (C.). — Ueber eine eigenartige, unter dem Bilde der Pseudoleukaemie verlaufende Tuberculose des lymphat. Apparates. *Zeitschrift f. Heilk.*, 1897 (Gravitz, S. 479.)

22. LOEWENBACH. — Beitrag zur Histologie der gummösen Lymphome. *Arch. für Derm. und Syphil.*, v. XLVIII, 1899 (Gravitz, *loc. cit.*, S. 482).

23. ASKANAZY. — Verhandl. d. Deutsch. pathol. Gesellsch., 1904 (Gravitz, *loc. cit.* S. 478).

24. FISCHER. — Ueber malign. Lymphom. *Arch. f. klin. Chir.*, v. LV (Gravitz, *loc. cit.*, 478).

25. SABRAZÈS. — Hématologie clinique. Paris, 1900 (*ibid.*).

26. DOMINICI. — *Arch. de médecine expérim.*, 1-13, 1901, p. 32.

27. AMATO (Luigi d'Amato). — Ueber experimentelle vom Magendarmkanal aus herforgerufene Veränderungen der Leber und über dabei gefundenen Veränderungen der übrigen Bauchorgane. *Virch. Arch.*, v. CLXXXVII, 1907.

ERRATUM

MÉMOIRE DE M. LEBOEUF, t. XXV, décembre 1911.

Page 890, 16e ligne, *lire* : « des individus fournisseurs de sérum toujours les mêmes », *au lieu de* : « qu'un nombre limité ».

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE MARS 1912 N° 3

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ÉMULSINE

Par MM. GABRIEL BERTRAND et ARTHUR COMPTON.

On ne connaît pas encore d'une manière définitive la constitution de l'amygdaline, mais on peut déjà considérer ce glucoside comme résultant de l'union du nitrile de l'acide mandélique (ou phénylglycolique) gauche avec un disaccharide analogue au maltose.

Traitée par l'extrait diastasique d'amandes douces ou émulsine, l'amygdaline subit une hydrolyse totale : non seulement le nitrile est séparé, puis décomposé en aldéhyde benzoïque et acide cyanhydrique (1), mais le disaccharide lui-même est scindé en deux molécules de glucose ordinaire.

$$C^{20}H^{27}O^{11}N + 2H^2O = C^6H^5.COH + CNH + 2C^6H^{12}O^6$$

Cette décomposition exige certainement la présence de deux diastases hydrolysantes dans l'émulsine, car elle peut être réalisée en deux temps distincts. Si, en effet, comme l'a montré E. Fischer (2), on fait agir la macération aqueuse de levure sur l'amygdaline, on n'obtient qu'une hydrolyse partielle : une

(1) La décomposition du nitrile, qui s'effectue déjà spontanément au sein de l'eau, serait accélérée, d'après Rosenthaler, par une diastase particulière, *Biochem. Zeit.*, t. XIV, p. 238 (1908) ; t. XVII, p. 257 (1909) ; t. XXVI, pp. 1, 7 et 9 (1910). Voir aussi K. FEIST, *Archiv d. Pharm.*, t. CCXLVII, p. 226 (1909) et t. CCXLVIII, p. 101 (1910).

(2) *Ber. d. chem. Ges.*, t. XXVIII, p. 1508 (1895).

seule molécule de glucose est séparée et il reste du mandélonitrilglucoside :

$$C^{20}H^{27}O^{11}N + H^2O = C^6H^{12}O^6 + C^{14}H^{17}O^6N,$$

ce dernier étant séparable, à son tour, par l'extrait d'amandes, en aldéhyde benzoïque, acide cyanhydrique et une seconde molécule de glucose.

En admettant le nom d'*amygdalose* pour le disaccharide engagé dans l'amygdaline et en se conformant à la nomenclature habituelle des diastases, on peut dire que la macération de levure renferme de l'*amygdalase* (1), active seulement vis-à-vis du disaccharide, tandis que l'émulsine contient, en outre, de l'*amygdalinase*, capable de séparer le nitrile de la molécule sucrée.

Les expériences que nous allons décrire concernant l'influence de la température sur l'activité de l'émulsine, ont été faites en tenant compte de cette manière de voir, c'est-à-dire que nous avons toujours mesuré simultanément l'activité de l'amygdalinase en dosant l'acide cyanhydrique et celle de l'amygdalase en déterminant le pouvoir réducteur.

De plus, comme nous avions l'intention de comparer les résultats obtenus avec ceux fournis antérieurement par l'étude de la cellase des amandes (2), nous avons opéré avec la même préparation diastasique — dont nous possédions une réserve suffisante — et, d'autre part, nous avons réalisé des conditions équivalentes de concentration en diastase et en substance hydrolysable.

Ainsi, au cours de nos expériences sur la cellase, nous avions fait réagir le poids de préparation diastasique extraite des amandes douces, qui était capable de dédoubler, après quinze heures d'action à la température optimale, environ 60 p. 100 du cellose, celui-ci étant dissous à raison d'une molécule gramme dans 27 litres 36, soit, pratiquement, de 50 milligrammes dans 4 centimètres cubes.

Nous avons pris, dans chacune des nouvelles expériences, la quantité (1 milligramme) de la même préparation diastasique

(1) Ce nom a d'ailleurs été proposé déjà par Caldwell et Courtauld (*Proc. Roy. Soc.*, t. LXXIX, p. 350, 1907).
(2) *Bulletin Soc. chim.*, 4e série, t. IX, p. 100 (1911).

qui pouvait, aussi après quinze heures d'action à la température optimale, dédoubler environ 60 p. 100 de l'amygdaline dissoute à la concentration d'une molécule gramme dans 27 lit. 36, soit de 373 milligrammes dans 20 centimètres cubes d'eau.

Le mode opératoire, comme dans nos précédentes expériences, a été le suivant :

La préparation diastasique, en quantité suffisante pour une série d'expériences, en général 10 milligrammes pesés au dixième de milligramme, a d'abord été dissoute dans mille fois son poids d'eau pure, redistillée dans le vide. Une demi-heure après le commencement de cette dissolution, on a prélevé 1 centimètre cube de liquide que l'on a introduit dans un petit matras renfermant 0 gr. 373 d'amygdaline cristallisée et 19 centimètres cubes d'eau pure. Le matras, étant alors bien bouché, a été plongé dans un bain réglé à température convenable.

Un quart d'heure après le premier prélèvement de la solution d'émulsine, on a prélevé un nouveau centimètre cube avec lequel on a préparé un second matras, et, ainsi de suite, de quart d'heure en quart d'heure, jusqu'à ce que le nombre de matras devant former une série ait été atteint.

A partir du moment où le premier matras a été laissé le temps voulu en réaction, on a commencé les analyses. Chaque matras étant examiné un quart d'heure après l'autre, à cause du temps nécessaire au dosage de l'acide cyanhydrique.

Voici comment ce dosage a été fait. On a intercalé successivement chaque matras dans un appareil distillatoire entre une chaudière et un réfrigérant. On a envoyé la vapeur, recueilli le distillat dans un verre à pied contenant 10 centimètres cubes d'ammoniaque, 10 centimètres cubes d'iodure de potassium au centième et quinze gouttes de lessive de soude à 40 p. 100, puis on a titré avec une solution de nitrate d'argent décinormale, suivant Denigès (1). A la fin de la distillation, on a pris la précaution d'arrêter le courant de réfrigération de manière à ce que la vapeur d'eau, cessant de se condenser, entraîne les dernières traces de CNH restées dans l'atmosphère du réfrigérant. L'opération a été arrêtée aussitôt que la vapeur tendait

(1) *Ann. Chim. Phys.*, 7e série, t. VI, p. 381 (1895).

à atteindre le mélange à titrer, pour que celui-ci ne s'échauffât pas, ce qui aurait reculé un peu le point de virage.

Les quantités d'acide cyanhydrique ont été calculées en tant pour cent de glucoside dédoublé. Limite d'erreur du dosage : une goutte au plus de solution décinormale d'argent, soit 0 milligr. 27 de CNH ou 1,4 p. 100 d'amygdaline.

Le tableau A contient les résultats donnés par l'amygdalinase dans quatre séries d'expériences.

TABLEAU A

TEMPÉRATURES extrêmes de chaque expérience.	P. 100 DE GLUCOSIDE DÉDOUBLÉ EN 15 HEURES d'après L'ACIDE CYANHYDRIQUE			
	1	2	3	4
13°2	....	17.8	»	»
22°5	32.9	32.9	»	»
30°0	46,6	»	»	»
35°0-35°1 . . .	....	....	....	53,4
38°0-38°1 . . .	....	57.6	»	»
38°5-38°4 . . .	....	....	....	57.6
38°9-39°0 . . .	....	....	63,0	»
39°0	61.7	»	»	»
40°2-40°8 . . .	....	....	57.6	»
41°0-41°2 . . .	....	60,3	»	»
41°5-41°6 . . .	....	....	....	54.8
42°0	....	....	61.7	»
44°1-44°0 . . .	....	....	57.6	»
45°0	58.9	»	»	»
46°0-45°9 . . .	....	56,2	»	»
46°3-46°5 . .	....	....	....	52.1
46°5-47°0 . . .	....	....	54.8	»
47°2-47°5 . . .	53,4	»	»	»
50°5-51°2 . . .	....	....	....	38,4
51°0-52°0 . . .	....	....	31.5	»
52°0-55°0 . . .	....	37.0	»	»
53°5-53°2 . . .	31,5	»	»	»
57°0-56°8 . . .	....	17.8	»	»
58°5-58°9 . . .	....	12,3	»	»

Ces résultats sont représentés d'une manière plus saisissable par la figure 1, dans laquelle les pourcentages de glucoside dédoublé sont portés en ordonnées et les températures en abscisses.

Le tableau B contient les résultats attribuables, dans les mêmes séries d'expériences, à l'amygdalase. Le pouvoir réducteur du liquide restant dans le ballon après le départ de l'acide

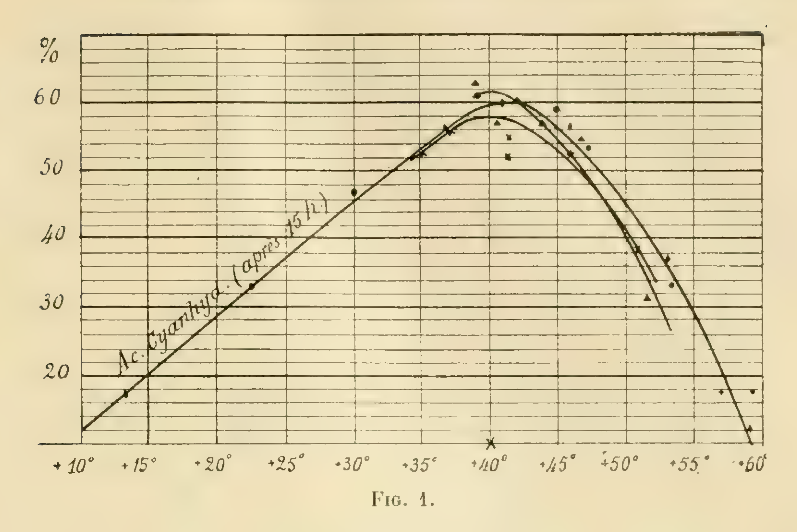


Fig. 1.

TABLEAU B

TEMPÉRATURES extrêmes de chaque expérience.	P. 100 DE GLUCOSIDE DÉDOUBLÉ EN 15 HEURES d'après LE POUVOIR RÉDUCTEUR			
	1	2	3	4
13°2	....	18,1	»	»
22°5	32,1	34,6	»	»
30°0	49,0	»	»	»
35°0-35°1 . . .	....	....	....	54,0
38°0-38°1 . . .	....	59,0	»	»
38°5-38°4 . . .	....	....	....	58,9
38°9-39°0 . . .	....	....	65,2	»
39°0	62,2	»	»	»
40°2-40°8 . . .	....	....	67,0	»
41°0-41°2 . . .	....	Manque.	»	»
41°5-41°6 . . .	....	....	....	57,0
42°0	....	....	60,1	»
44°1-44°0 . . .	....	....	57,0	»
45°0	53,8	»	»	»
46°0-45°9 . . .	....	56,5	»	»
46°3-46°5 . . .	....	....	....	50,9
46°5-47°0 . . .	....	....	51,9	»
47°2-47°5 . . .	53,4	»	»	»
50°5-51°2 . . .	....	....	....	35,5
51°0-52°0 . . .	....	....	31,7	»
52°0-55°0 . . .	....	35,0	»	»
53°5-53°2 . . .	29,8	»	»	»
57°0-56°8 . . .	....	16,3	»	»
58°5-58°9 . . .	....	12,2	»	»

cyanhydrique a été déterminé sur une partie aliquote (1/5 du volume ramené à 100) suivant la technique décrite autre part

par l'un de nous (1); les chiffres, exprimés en glucose, ont servi ensuite à calculer les proportions de glucoside dédoublé, en supposant que deux molécules de glucose aient été produites par une d'amygdaline. Limite d'erreur du dosage : une à deux gouttes de solution de permanganate à 0,5 p. 100, soit 0 milligr. 27 à 0 milligr. 54 de glucose ou 0,1 à 0,2 p. 100 d'amygdaline.

Voici la figure tracée avec les résultats :

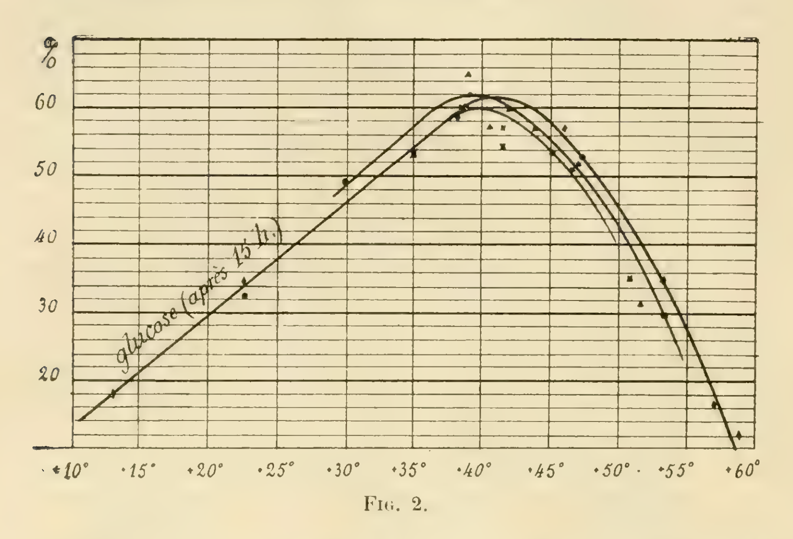


Fig. 2.

L'examen des deux tableaux A et B, ou des deux figures I et II, montre que, dans les conditions où nous nous sommes placés, la température la plus favorable au dédoublement de l'amygdaline par les diastases des amandes douces est située au voisinage de + 40 degrés. Nous avions, dans des conditions expérimentales comparables, trouvé + 46 degrés environ pour le dédoublement du cellose (2).

Le même examen montre de plus que l'amygdalase et l'amygdalinase se comportent, toujours dans ces conditions spéciales, à peu près de la même manière sous l'influence de la température : aux erreurs près d'expériences, en effet, les chiffres sont identiques et les courbes superposables.

(1) *Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. XXXV, p. 1285 (1906).
(2) *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 100 (1911).

Il n'en est plus tout à fait de même si, au lieu de maintenir 15 heures les mélanges en réaction, on limite la durée des expériences à deux heures (en prenant trois fois plus de diastase, pour que les proportions de glucoside dédoublé restent facilement mesurables).

Les résultats obtenus dans ces nouvelles conditions sont rassemblés dans les tableaux C et D ; représentés graphiquement, ils fournissent les séries de courbes des figures III et IV.

TABLEAU C

TEMPÉRATURES EXTRÊMES de chaque expérience.	P. 100 DE GLUCOSIDE DÉDOUBLÉ EN 2 HEURES d'après L'ACIDE CYANHYDRIQUE						
	1	2	3	4	5	6	7
41°8-41-6 . . .	50,7	»	»	»	»	»	»
43°5-43°7 . . .	52,1	»	»	»	»	»	»
46°8-46°0 . .	54.8	»	»	»	»	»	»
48°6-48°2 . . .	57.6	»	»	»	»	»	»
49°0	....	60,3	»	»	»	»	»
49°0-49°2 . . .	60.3	»	»	»	»	»	»
50°8-51°0 . . .	60,3	»	»	»	»	»	»
51°0	....	64.4	»	»	»	»	»
52°8-53°0 . . .	....	....	64.4	»	»	»	»
53°4-53°3 . . .	....	67,1	»	»	»	»	»
54°0	....	....	68,5	»	»	»	»
54°1-54°2 . . .	....	....	....	67,2	»	»	»
55°6-55°5 . . .	....	....	....	68,5	»	»	»
55°7-55°5 . . .	....	71,3	»	»	»	»	»
56°0	....	....	....	69,9	»	»	»
55°8-56°0 . . .	....	....	....	....	....	58,9	»
56°8-57°0 . . .	....	....	65,8	»	»	»	»
57°2	....	....	....	69,9	»	»	»
57°5-57°8 . . .	....	....	68,5	»	»	»	»
57°8	....	71,3	»	»	»	»	»
58°0	....	....	....	....	....	60,3	»
58°1-58°2 . . .	....	....	....	72,7	»	»	»
58°5-59°2 . . .	....	71,3	»	»	»	»	»
58°8-59°0 . . .	....	....	....	....	....	....	58.9
59°1	....	....	....	69,9	»	»	»
59°5	....	....	68.5	»	»	»	»
59°9-60°0 . . .	....	....	....	....	69,9	»	»
60°7-60°8 . . .	....	....	....	....	....	52,1	»
60°8-61°0 . . .	....	....	....	....	71.3	»	»
62°0	....	....	64,4	»	»	»	»
63°8-64°0 . . .	....	....	....	....	65,8	»	»
63°9-64°0 . . .	....	....	....	....	....	42,5	»
65°8-66°0 . . .	....	....	....	....	60.3	»	»
66°9-67°0 . . .	....	....	....	....	....	27,4	»
69°0-69°2 . . .	....	....	....	....	....	17,8	»

TABLEAU D

TEMPÉRATURES extrêmes de chaque expérience.	P. 100 D'AMYGDALINE DÉDOUBLÉ EN 2 HEURES d'après LE POUVOIR RÉDUCTEUR						
	1	2	3	4	5	6	7
41°8-41°6 . . .	54,9	»	»	»	»	»	»
43°5-43°7 . . .	57.4	»	»	»	»	»	»
46°8-46°0 . . .	60.4	»	»	»	»	»	»
48°6-48°2 . . .	61.6	»	»	»	»	»	»
49°0	....	66,7	»	»	»	»	»
49°0-49°2 . . .	63,7	»	»	»	»	»	»
50°8-51°0 . . .	63,5	»	»	»	»	»	»
51°0	....	68,4	»	»	»	»	»
52°8-53°0 . . .	....	....	68,8	»	»	»	»
53°4-53°3 . . .	....	68.4	»	»	»	»	»
54°0	....	....	69,4	»	»	»	»
54°1-54°2 . . .	....	....	....	69.4	»	»	»
55°6-55°5 . . .	....	....	....	68,4	»	»	»
55°7-55°5 . . .	....	72.4	....	»	»	»	»
56°0	....	....	....	73,4	»	»	»
55°8-56°0 . . .	....	....	....	....	....	61.2	»
56°8-57°0 . . .	....	....	68.4	»	»	»	»
57°2	....	....	....	70.3	»	»	»
57°5-57°8 . . .	....	....	70,9	»	»	»	»
57°8	....	70,9	»	»	»	»	»
58°0	....	....	....	....	....	59.0	»
58°1-58°2 . . .	....	....	....	69,4	»	»	»
58°5-59°2 . . .	....	70,3	»	»	»	»	»
58°8-59°0 . . .	....	....	....	....	....	....	60.4
59°1	....	....	....	68,4	»	»	....
59°5	....	....	69.4	»	»	»	....
59°9-60°0 . . .	....	....	....	....	68,4	»	....
60°7-60°8 . . .	....	....	....	....	....	54.0	....
60°8-61°0 . . .	Manque.						
62°0		....	65.8	»	»	»	....
63°8-64°0 . . .	....	....	....	....	67,3	»	....
63°9-64°0 . . .	....	....	....	....	....	41.4	....
65°8-66°0 . .	....	....	....	....	60,4	»	....
66°9-67°0 . . .	....	....	....	....	....	26,8	....
69°0-69°2 . . .	....	....	....	....	....	16.7	....

Ces nouveaux résultats sont instructifs à comparer soit avec les précédents, soit simplement entre eux.

Dans le premier cas, ils montrent que la température optimale, loin d'être une sorte de constante, comme on l'admet habituellement, varie beaucoup, au contraire, avec la durée des expériences. Ici, l'action destructrice de diastase due à l'élévation de la température étant beaucoup moins marquée que celle due à la prolongation du chauffage, la température optimale se trouve située d'autant plus haut que la durée de l'expérience

est plus courte. Trouvée au voisinage de 56 à 58 degrés après deux heures, elle s'abaisse à 40 degrés environ si on attend 15 heures pour la déterminer.

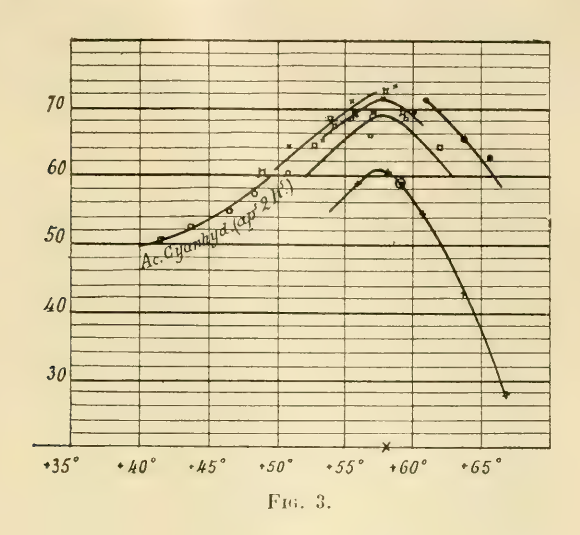


Fig. 3.

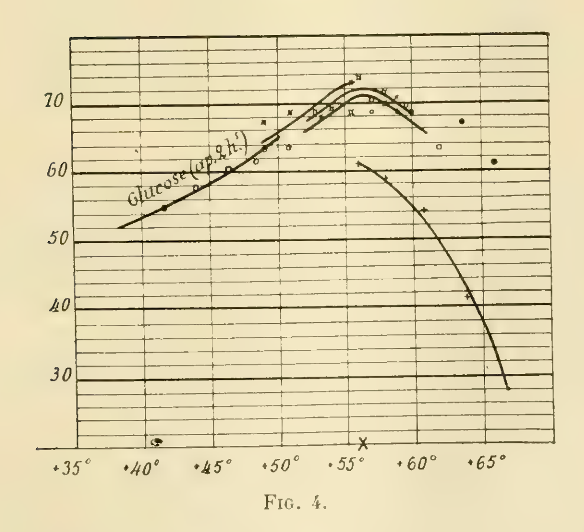


Fig. 4.

La comparaison des derniers résultats entre eux montre, d'autre part, que les courbes de l'amygdalase et de l'amygdalinase, qui étaient sensiblement les mêmes dans les expériences de 15 heures, sont devenues nettement distinctes : la première

présentant un maximum d'activité voisin de + 56 degrés et la seconde de + 58 degrés.

La figure V, obtenue après un décallage en hauteur des courbes partielles et une légère retouche d'ensemble (1), fait ressortir, en la schématisant un peu, il est vrai, la manière différente dont se sont comportées l'amygdalase et l'amygdalinase sous l'influence de la température, dans les dernières expériences.

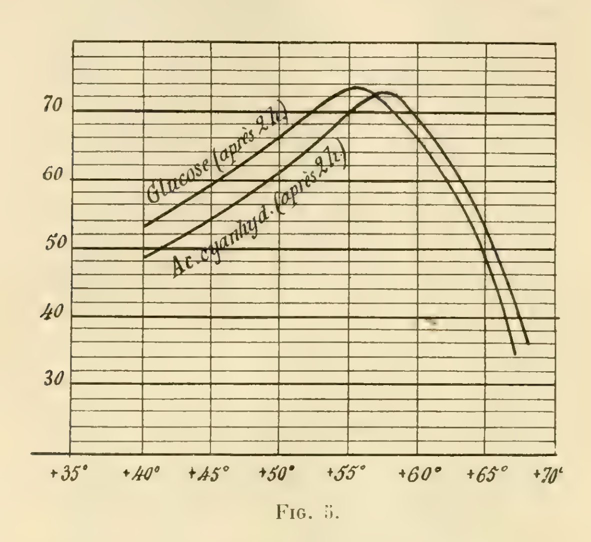


Fig. 5.

En résumé, dans la préparation diastasique retirée des amandes sous le nom d'émulsine, il y a lieu de distinguer, au point de vue de l'action sur l'amygdaline, deux diastases différentes : 1° *l'amygdalinase*, qui, si elle était seule, scinderait la glucoside en nitrile phénylglycolique et en amygdalose, exactement comme la vicianinase scinde la vicianine en nitrile phénylglycolique et en vicianose (2), et : 2° *l'amygdalase*, dont l'action

(1) On remarquera qu'en pesant les dix milligrammes de préparation diastasique nécessaires à l'exécution d'une série d'expériences, une erreur d'un dixième de milligramme correspond déjà à une différence d'un pour cent. Etant donnés l'état pulvérulent de la préparation et ses propriétés hygroscopiques, une différence de plusieurs dixièmes de milligramme est possible d'une pesée à une autre. C'est probablement pour cela, surtout, que les courbes partielles, correspondant à chaque série d'expériences, sont situées à des hauteurs un peu différentes.

(2) Gab. Bertrand et G. Weisweiller, *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 38, p. 84 et p. 147 (1911).

hydrolysante est limitée à l'amygdalose comme celle de la vicianase l'est au vicianose (1).

L'amygdalinase et l'amygdalase se comportent à peu près de même sous l'influence de la chaleur ; elles présentent une température optimale d'autant plus haute que la durée de l'expérience faite pour la déterminer est plus courte. Dans une expérience de 15 heures, la température optimale est presque identique pour chacune d'elles et voisine de + 40 degrés ; dans une expérience de deux heures, cette température monte à + 56 degrés pour l'amygdalase et à + 58 degrés pour l'amygdalinase (2).

Dans les conditions où ils ont été obtenus, ces résultats ne fournissent pas seulement un argument en faveur de l'individualité de l'amygdalinase et de l'amygdalase, ils apportent encore une preuve nouvelle de la différence, d'abord si difficile à établir, existant entre ces deux diastases et celle, également contenue dans l'émulsine, qui hydrolyse le cellose.

Enfin, en se plaçant à un point de vue plus général, ces résultats démontrent de la manière la plus nette que la température optimale, loin d'être une valeur constante, varie beaucoup avec la durée de l'expérience et qu'elle ne saurait servir à caractériser certaines diastases que dans des conditions rigoureusement comparables.

(1) Gab. Bertrand et G. Weisweiller, *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 38, p. 84 et p. 147 (1911).

(2) Il est intéressant de rappeler ici qu'en traitant l'amygdaline par l'émulsine, à une température non indiquée, Auld a vu se produire relativement plus de sucre réducteur que d'acide cyanhydrique ou d'aldéhyde benzoïque. En arrêtant l'hydrolyse lorsqu'elle atteignait environ 75 p.100, il a même réussi à isoler un peu de mandélonitrilglucoside (*J. Chem. Soc.*, t. XCIII, p. 1276, 1908).

H. E. Armstrong, E. F. Armstrong et E. Horton ont observé, d'autre part, en faisant agir l'émulsine sur l'amygdaline à la température constante de + 25°, que l'hydrolyse était généralement plus grande lorsqu'on l'évaluait d'après le pouvoir réducteur que d'après l'acide cyanhydrique. Dans une série particulière d'expériences, la différence a augmenté d'abord avec le temps, puis elle a diminué jusqu'à devenir presque nulle après 25 heures (*Proceedings Roy. Soc.*, t. LXXX, p. 321, 1908).

Ces résultats, qui ont pu être produits en dehors des différences dans les températures optima, par la simple disproportion des diastases présentes, sont au moins d'accord avec les nôtres en ce qui concerne l'existence distincte de l'amygdalase et de l'amygdalinase dans l'émulsine.

L'IMPORTANCE DE LA PHAGOCYTOSE DANS L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS

A L'ÉGARD DE QUELQUES FLAGELLÉS

par P. DELANOË

(Avec la Pl. III.)

(Travail du laboratoire de M. Mesnil, à l'Institut Pasteur.)

Il y a dix ans que Laveran et Mesnil ont, pour la première fois, dans un mémoire publié dans ces *Annales* (1), montré que l'immunité du rat, blanc ou pie, à l'égard du *T. Lewisi* Kent, est uniquement d'ordre phagocytaire.

Chez le rat, activement immunisé, ces deux savants ont montré que la destruction des trypanosomes a lieu dans la cavité péritonéale même, c'est-à-dire au lieu de l'injection, sans que les parasites puissent pénétrer dans la circulation sanguine. En observant en goutte pendante et en frottis colorés le liquide péritonéal d'un rat activement immunisé et récemment inoculé, Laveran et Mesnil ont très nettement vu toutes les phases de la phagocytose. Les flagellés, tout en gardant leur pleine mobilité, se piquent sur les phagocytes. Ceux-ci ne tardent pas à réagir et poussent de part et d'autre du parasite deux fins tentacules qui finissent par l'englober en totalité. Le trypanosome, qui, jusqu'à la fin, n'a cessé de se révolter contre la prise du leucocyte, une fois inclus dans le cytoplasme de ce dernier, est très rapidement digéré ; si bien qu'à la coloration, on ne retrouve, la plupart du temps, à l'intérieur des mononucléaires, que des boules irrégulières présentant les réactions de la chromatine et qu'il est possible d'interpréter comme les derniers vestiges de la digestion des trypanosomes.

Chez le rat, passivement immunisé, auquel ils injectent successivement dans le péritoine un sérum très actif et des trypano-

(1) « Recherches morphologiques et Expérimentales sur le Trypanosome des Rats (*T. Lewisi* Kent)», n° du 25 septembre 1901. Voir aussi : *Trypanosomes et Trypanosomiases*. Paris, Masson, 1904.

somes, Laveran et Mesnil constatent la destruction des parasites par phagocytose. Les flagellés, demeurés mobiles malgré l'action agglutinante du sérum, sont englobés en pleine vitalité et cela tout comme chez le rat en immunité active. Ajoutons que Laveran et Mesnil ont très minutieusement mis en évidence que les actions agglutinante et préventive du sérum *anti-Lewisi* sont des propriétés nettement distinctes.

Ainsi, dès 1901, Laveran et Mesnil établissent, les premiers, ces deux faits essentiels : l'immunité active et passive du rat à l'égard du *T. Lewisi* est fonction d'une *stimulation* phagocytaire ; les trypanosomes sont détruits en pleine vitalité.

En outre, dans leur mémoire, ces auteurs montrent que le cobaye est susceptible de s'infecter légèrement à la suite d'une inoculation péritonéale de *T. Lewisi* : ils constatent, en effet, pour la première fois, une discrète multiplication des parasites dans le péritoine de cet animal. Avec Kanthack, Durham et Blandford (1), ils établissent que le trypanosome des rats, inoculé dans le péritoine du cobaye, pénètre dans le sang où ils le retrouvent déjà vingt-quatre heures après l'inoculation. Les trypanosomes augmentent d'abord de nombre dans la circulation sanguine jusqu'à atteindre 1/20e à 1/50e des hématies, puis deviennent plus rares et enfin disparaissent. La disparition des trypanosomes du péritoine est due à la phagocytose.

Il ressort de ces expériences que la phagocytose joue un rôle capital aussi bien chez le rat, animal réceptif, que chez le cobaye, animal réfractaire, infectés avec le *T. Lewisi*. C'est même pour ces auteurs le seul mode de disparition du parasite.

Levaditi et Sevin (2) montrent en 1905 que l'immunité de la souris et des calfats, naturellement réfractaires au *T. paddæ*, est une immunité d'ordre phagocytaire. Le trypanosome, avant de disparaître, est susceptible de se multiplier légèrement.

Sauerbeck (3), dans la consciencieuse étude qu'il a consacrée

(1) *Proceedings of the R. Society*, t. LXIV, 1898, et *Hygienische Rundschau*, n° 24, 1898.
(2) *Comptes Rendus de la Soc. de Biologie*, 15 avril 1905, p. 694, t. LVIII.
(3) *Zeitsch. f. Hyg. und Inf. Krankheiten*, 1905.

à l'histologie pathologique de l'infection des rats, des cobayes, des lapins et des chiens, par le Trypanosome du Nagana (*T. Brucei*), considère la phagocytose comme l'arme fondamentale de la défense. Par la méthode des coupes aussi bien que par celle des frottis, SAUERBECK a observé la phagocytose dans la rate, le foie, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et l'épiploon. Il a très rarement observé des figures typiques de phagocytose : il n'a constaté, la plupart du temps, dans les mononucléaires des viscères et dans les cellules qui leur sont propres (cellules de Kupffer pour le foie, cellules endo-alvéolaires pour le poumon et peut-être cellules endothéliales des sinus pour les ganglions lymphatiques) que des restes analogues à des noyaux de flagellés.

En ponctionnant le péritoine des cobayes inoculés, depuis vingt-quatre à quarante-huit heures, avec *T. Brucei*, SAUERBECK a pu constater l'attachement des flagellés aux leucocytes, soit par leur extrémité antérieure, soit par leur extrémité postérieure. Les trypanosomes attachés à un seul mononucléaire étaient au nombre de plusieurs, deux, trois et même quatre. SAUERBECK n'a pu constater l'englobement en pleine vitalité des éléments fixés. Il ne nie d'ailleurs pas le processus décrit par LAVERAN et MESNIL, « puisque ces auteurs l'ont constaté », mais il croit que ce processus doit être très rare. SAUERBECK pense que le trypanosome une fois attaché au leucocyte est d'abord paralysé par un poison que sécrète le globule blanc. Il perd alors ses mouvements et, lorsque le phagocyte s'apprête à l'englober, il est déjà réduit à l'état de « grumeaux » plus ou moins ronds. Bref, l'originalité de la conception de SAUERBECK est que le trypanosome, une fois fixé au phagocyte, est d'abord paralysé par une sécrétion du globule blanc avant d'être incorporé. « Dans la règle, dit SAUERBECK, il se produit d'abord une fixation, puis une paralysie (1) ».

RODET et VALLET (2), dans la rate du rat et du chien naganés (*T. Brucei*), constatent à l'approche de la mort et surtout après elle, une destruction très accentuée des trypanosomes en dehors

(1) « In der Regel aber wird wohl eine Fixirung und nachfolgende Lähmung den Process einleiten », p. 77 du tiré à part.

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*; 28 mai 1906, 6 août 1906, 29 juillet 1907, et *Archives de Médecine Expérimentale*, juillet 1906.

des leucocytes. Pour eux, SAUERBECK a eu tort de négliger ce phénomène qu'il a vu le premier « pour exagérer l'importance de la phagocytose (1) ». Celle-ci n'a qu'un rôle secondaire. Elle se borne à enlever les déchets des trypanosomes détruits par l'action trypanocide de la rate. Du reste, il n'y a aucun doute. En mélangeant, entre lame et lamelle, une goutte de sang nagané et une goutte de suc splénique, RODET et VALLET n'ont-ils pas constaté la mort rapide des trypanosomes?

LAVERAN et THIROUX (2) ont critiqué les résultats obtenus par RODET et VALLET en ce qui concerne la propriété trypanolytique de la rate. Leurs expériences ont été faites chez des cobayes inoculés avec *T. togolense* (virus fort de Martini) et des chiens inoculés avec *T. Pecaudi*. Pour LAVERAN et THIROUX, les frottis faits avec la rate, sitôt après la mort, ne montrent pas de trypanosomes désintégrés. L'extrait de rate ne jouit d'aucune action trypanocide. Les résultats de RODET et VALLET s'expliquent en grande partie par des fautes de technique (3).

MANTEUFEL (4), en injectant des *T. Lewisi* dans le péritoine de rats immunisés activement ou passivement, a bien vu l'attachement des trypanosomes aux mononucléaires par leur extrémité non flagellée. Ce phénomène n'aurait cependant aucune importance : les trypanosomes, au cours de leurs mouvements, sont susceptibles de s'attacher à tout ce qu'ils rencontrent sur leur passage, globules rouges et bulles d'air aussi bien que leucocytes. MANTEUFEL n'a pas vu l'attachement des trypanosomes être suivi d'englobement. « Une seule fois, il a pu observer, sans aucun doute, un trypanosome mobile, bien reconnaissable, à l'intérieur d'un globule blanc. » A l'examen des frottis colorés,

(1) P. 479 du *Mémoire des Archives de Médecine Expérimentale.*

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1er et 29 juillet 1907, et *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, août 1907.

(3) Nous noterons ici, simplement à titre documentaire, que JAFFÉ (*Centr. f. Bakter. I, Orig.*, t. LV, f. 6, 6 septembre 1910, pp. 519-527) a montré que les produits d'autolyse de la rate du rat, du lapin et du cobaye, neufs ou naganés, exercent une action trypanocide marquée. Il est, en conséquence, légitime de se demander si, dans certaines expériences faites *in vitro*, RODET et VALLET n'ont pas eu affaire, à leur insu, à des phénomènes d'autolyse. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les expériences de RODET et VALLET ont été faites, à Montpellier, *en été* (p. 481 du mémoire). On sait bien aujourd'hui que les endoferments cellulaires, responsables des phénomènes d'autolyse, ont leur optimum d'action à 38 et 40 degrés. Consulter à ce sujet l'excellente Revue de L. LAUNOY in *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1908, t. VI.

(4) *Arbeiten aus dem Kaiserlichem Gesundheitsamte*, novembre 1909.

l'auteur n'a rencontré à l'intérieur des leucocytes que de petits amas, plus ou moins irréguliers, ayant les réactions de la chromatine et qu'il interprète comme des vestiges de trypanosomes. MANTEUFEL pense que la destruction des trypanosomes relève exclusivement de la propriété lytique des humeurs.

En février 1909, F. MESNIL et E. BRIMONT (1) ont étudié le mode de destruction des trypanosomes du Nagana du Togoland, *T. togolense* MESNIL et BRIMONT (2), inoculés dans le péritoine des souris en mélange *in vitro* avec le sérum d'un bouc infecté avec ce virus. Ces auteurs ont constaté que la disparition des trypanosomes pathogènes a lieu chez la souris d'une manière identique à celle du *T. Lewisi* chez le rat immunisé. L'englobement du trypanosome du Nagana se fait même plus rapidement que celui du *T. Lewisi*.

Toujours en février 1909, MASSAGLIA (3) fit paraître un long travail dont une grande partie est consacrée à l'étude de l'immunité dans les trypanosomiases.

C'est sur le cobaye, injecté avec le *T. Lewisi*, que MASSAGLIA poursuivit ses « recherches relatives à la manière dont les trypanosomes sont détruits quand on les inocule à des animaux réfractaires ». Les expériences de MASSAGLIA portent sur *deux* cobayes de 300 et 400 grammes.

Pour MASSAGLIA, le cobaye serait absolument réfractaire au *T. Lewisi*, qui ne passerait pas dans la circulation sanguine et serait détruit en quelques heures dans le péritoine, à l'endroit de l'injection. En faisant des ponctions abdominales de demi-heure en demi-heure, MASSAGLIA aurait constaté que les trypanosomes ne commencent à être détruits qu'au bout d'une heure et demie à deux heures après le moment de l'injection. Jusqu'alors, les flagellés resteraient en parfaite intégrité. Il y a donc, de l'aveu même de MASSAGLIA, une phase en quelque sorte latente, qui suit l'injection des parasites, au cours de laquelle ceux-ci demeurent intacts; phase de durée sensible puisqu'elle peut persister deux heures, c'est-à-dire la moitié

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, février 1909.

(2) F. MESNIL. Sur l'identification de quelques trypanosomes pathogènes. *Société de Pathologie Exotique*, juin 1910.

(3) Communication faite à la Société médico-chirurgicale de Modène, séance du 13 février 1909.

du temps nécessaire à la destruction de tous les parasites. Pour MASSAGLIA, le rôle de la phagocytose, chez le cobaye, est sinon nul, du moins très secondaire. Ce sont les trypanolysines contenues dans le liquide péritonéal qui détruisent les microbes et nullement les phagocytes. La destruction des trypanosomes a lieu par un mécanisme analogue à celui qui se passe chez les animaux immunisés contre le vibrion de Koch (1).

L'immunité active et passive du rat à l'égard du *T. Lewisi* serait également pour MASSAGLIA d'ordre humoral.

Au mois de septembre 1909, ce savant (2), étendant ses premières recherches, étudia, dans le laboratoire du professeur LAVERAN, le mode naturel de défense de certains vertébrés à sang froid — couleuvre à collier, tortues, grenouilles (maintenues à la température ordinaire ou chauffées), tritons, lézards — à l'égard du trypanosome du Surra, *T. Evansi* STEEL, inoculé sous forme de sang de cobaye, de rat et de souris riche en parasites. MASSAGLIA ne constate pas la phagocytose : les trypanosomes sont très rapidement détruits en dehors des leucocytes.

LEVADITI et MUTERMILCH (3) ont dernièrement appelé l'attention sur le mécanisme de la phagocytose.

En mélangeant, dans un tube à essai, 1 goutte de sang de souris naganée (*T. Brucei*), des globules blancs de cobaye neuf et du sérum trypanolytique, préalablement inactivé, de cobaye saigné au moment de la crise (RODET et VALLET, MASSAGLIA), ces

(1) Cette comparaison est faite également par Mc NEAL au cours d'un mémoire sur « le Cycle évolutif du *T. Lewisi* et du *T. Brucei* ». *Journ. of Inf Diseases,* vol. I, n° 4, 5 nov. 1904, p. 517-543. Voici le passage de Mc NEAL auquel nous faisons allusion : « By injecting trypanosomes (*T. Lewisi*) into the peritoneal cavity of guinea pigs immunized to this organism, and subsequently examining the peritoneal fluid, LAVERAN et MESNIL were able to find various stages of ingestion of the protozoa by the leucocytes. We have attempted to confirm this by a similar procedure. Instead of phagocytosis, howewer, we could find evidence only of the immobilization and gradual solution of the trypanosomes in the peritoneal fluid. Stains made from time to time showed the protoplasm of the parasites paler than before, until finally it seemed to have dissolved. The process appeared to be quite analogous to that met with in the well-Known Pfeiffer's phenomenon. In other words, the trypanosomes disappear as the result of the presence and action of cytolytic agents rather than by phagocytosis. » P. 526-527.

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 13 septembre 1909, p. 516.

(3) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 18 juin 1910, t. LXVIII, p. 1079.

auteurs constatent que les trypanosomes, après s'être fixés sur les leucocytes, sont finalement englobés.

L'attachement des trypanosomes aux leucocytes est un phénomène *d'ordre physico-chimique*, dans lequel la vitalité des leucocytes n'est pour rien. Il se produit aussi bien avec des leucocytes tués (par séjour prolongé à 0 degré, par congélations et décongélations successives, par chauffage à 45 degrés, 55 degrés et même 60 degrés) qu'avec des leucocytes vivants.

Cet attachement n'en est pas moins spécifique. Mélangés à une bouillie d'organe (foie ou rein), les trypanosomes se fixent exclusivement sur les leucocytes contenus dans cette bouillie.

Le trypanosome, au cours de l'englobement, ne resterait mobile qu'autant que la région du noyau n'est pas atteinte, mais, « *à partir de ce moment, il se meut de moins en moins, finit par s'immobiliser et devient transparent* (TRYPANOLYSE) *avant qu'il soit totalement phagocyté* ». LEVADITI et MUTERMILCH pensent que les leucocytes vivants, excités par l'attachement de l'objet phagocytable, sécrètent un poison microbicide destiné à imprégner le trypanosome sensibilisé et à le détruire, avant qu'il soit complètement incorporé. Cette sécrétion aurait lieu au moment même de l'acte phagocytaire, car il a été impossible à LEVADITI et à MUTERMILCH de retirer des globules blancs une substance capable de détruire *in vitro* les trypanosomes sensibilisés.

De cet ensemble de données bibliographiques, il ressort qu'il existe une divergence d'opinions : LAVERAN et MESNIL, MESNIL et BRIMONT décrivent des phénomènes de phagocytose tout à fait typiques; MASSAGLIA, MANTEUFEL, RODET et VALLET pensent au contraire que la destruction des trypanosomes relève exclusivement de l'action trypanocide des humeurs, les leucocytes jouant seulement le rôle de balayeurs de déchets.

SAUERBECK est d'opinion mixte : la destruction des trypanosomes est due au leucocyte. Celui-ci est l'âme même de la défense. Seulement la destruction des parasites, à cause de l'activité toxique des globules blancs, arriverait avant que l'englobement soit complet. Telle est aussi, nous l'avons vu, l'opinion de LEVADITI.

Il n'était donc pas sans intérêt d'envisager à nouveau l'importance de la phagocytose dans la destruction des flagellés. Nous avons dans ce but étudié, sur les conseils de notre maître M. Mesnil, professeur à l'Institut Pasteur, l'immunité de la souris à l'égard d'un certain nombre de protozoaires.

L'IMMUNITÉ NATURELLE DE LA SOURIS A L'ÉGARD DES CULTURES DE BOUTON D'ORIENT ET DE KALA-AZAR TUNISIENS

(*Leishmania tropica* J. H. Wright, 1903, et *Leishmania infantum* Ch. Nicolle, 1908.)

La souris blanche possède à l'égard des cultures (1) de Kala-Azar et de bouton d'Orient tunisiens une immunité naturelle très forte, que des injections péritonéales fréquemment répétées et faites pendant des mois n'arrivent pas à vaincre (1). Ainsi, du 7 octobre 1910 au commencement de mars 1911, nous avons, sans aucun succès, inoculé, à cinq ou six jours d'intervalle, douze souris avec des cultures de ces virus arrivées au

(1) Ces cultures ont été aimablement fournies à M. Mesnil par M. Ch. Nicolle, de Tunis. Elles ont été depuis régulièrement entretenues dans le laboratoire de M. Mesnil par passages en milieu Novy, simplifié par Ch. Nicolle. Voici la manière exacte dont nous préparons le milieu de culture : sel marin, 6 grammes; gélose *non lavée*, 14 grammes; eau, 900 cent. cubes. Répartir dans des tubes sans neutralisation ou alcalinisation préalable, puis stériliser à l'autoclave par un chauffage à 120 degrés un quart d'heure. Les tubes sont encapuchonnés et conservés à l'abri de la lumière. Au moment de s'en servir, on en fait fondre le contenu dans de l'eau bouillante. On les laisse ensuite se refroidir et quand la température est descendue à 45-50 degrés, on y incorpore, en volume, un tiers de sang *défibriné* de lapin. On mélange intimement gélose et sang. Les tubes, afin de permettre au milieu d'adhérer au verre, sont conservés, inclinés, à 28° pendant une nuit. Le lendemain, on les encapuchonne de nouveau et on les place à 37 degrés seulement deux à trois heures. Cela suffit pour permettre au liquide de condensation de se former en petite quantité. Les tubes sont ensuite placés à la glacière, où on peut les conserver pendant un mois et plus, à une température voisine de 0 degré, jusqu'au moment de l'ensemencement. Le sang défibriné doit être aussi frais que possible. Il est entendu qu'avant la préparation des milieux, on en éprouvera la stérilité par ensemencement en bouillon simple.

(2) MM. A. Laveran et A. Pettit ont pu déterminer chez la souris et le rat des infections légères, essentiellement guérissables, en leur inoculant une émulsion de rate et de foie de chien infecté de Kala-Azar tunisien.

maximum de leur développement. Les injections étaient faites à la dose de un demi-centimètre cube environ.

Le mécanisme de cette immunité naturelle est des plus simples. Il est le même, qu'il s'agisse de Bouton d'Orient ou de Kala-Azar. Il est particulièrement facile à mettre en évidence avec les cultures de Bouton d'Orient; car ces cultures, en milieu Novy simplifié, sont sensiblement plus riches que celles de Kala-Azar. Sitôt injectés, les leptomonas de culture se piquent sur les lymphocytes, gros et petits, qui normalement abondent dans le péritoine de la souris. Cette fixation des flagellés est très rapide. Déjà, une minute après l'injection, on constate qu'un grand nombre de leptomonas sont adhérents. En quinze minutes, la fixation est quasi totale. Le nombre des flagellés attachés à un leucocyte est très variable. On peut en constater jusqu'à 10 à 12 sur un seul globule blanc. C'est ordinairement par l'extrême bout du flagelle que les leptomonas se piquent sur les leucocytes, mais ils peuvent y adhérer soit par leur extrémité postérieure, soit plus rarement en un point quelconque du corps.

On peut aussi constater, mais rarement, la fixation d'un leptomonas sur un globule rouge; cette fixation a lieu par le bout du flagelle. Elle peut être telle que le leptomonas n'arrive pas à se débarrasser de l'hématie, qu'il secoue avec violence.

La fixation des leptomonas n'a donc pas lieu exclusivement sur les globules blancs. Nous n'avons pas vu plusieurs leptomonas attachés à un seul globule rouge. Par contre, ce fait est très fréquent avec les mononucléaires.

Les lymphocytes ne tardent pas à réagir à la fixation des protozoaires. On peut les voir, sous le microscope, une fois accommodés à la température du laboratoire, montrer un petit promontoire protoplasmique juste au point de fixation du flagelle, puis, de part et d'autre de celui-ci, allonger deux minces et fins pseudopodes, transparents et dépourvus de granulations cytoplasmiques. Ces pseudopodes, peu à peu, grandissent et finissent par saisir en totalité le leptomonas. Une fois l'englobement complet, le leucocyte rentre ses pseudopodes et régularise son contour. Peu après, on voit apparaître en plein cytoplasme, une vacuole claire, transparente, ronde

ou plus fréquemment ovalaire, à contours parfaitement nets, dans laquelle on distingue le leptomonas, renflé en boule, dont les contours épousent étroitement ceux de la vacuole. Celle-ci, on le devine, n'est rien autre qu'une vacuole digestive. Rapidement, en effet, le protozaire inclus devient transparent; les granulations cytoplasmiques de son protoplasme sont animées d'un mouvement brownien très net, diminuent de grosseur, puis de nombre, et ainsi jusqu'à disparition complète. Il est d'ailleurs facile de contrôler par des préparations colorées toutes les phases de la digestion phagocytaire qu'on aura pu suivre simplement entre lame et lamelle. Il suffit même de déposer sur une lame une goutte de l'exsudat péritonéal d'une souris neuve et une goutte de culture et de recouvrir le tout d'une lamelle pour assister *in vitro* à toutes les phases de l'englobement.

La technique que nous avons employée, pour la coloration des frottis de liquide péritonéal, est la suivante : fixation humide aux vapeurs osmiques (solution aqueuse à 1 p. 100) quinze secondes; après dessiccation, surfixation à l'alcool-éther, parties égales, deux minutes. Laisser sécher. Laver à l'eau courante et colorer vingt minutes dans une dilution de Giemsa, au 10e (1 cent. cube de Giemsa pour 10 cent. cubes d'eau distillée).

Il est nécessaire que la coloration suive de près la fixation. Des préparations fixées seulement depuis 48 heures se colorent mal, dans tous les cas moins bien que si elles avaient été colorées de suite après la fixation.

Pour les frottis, les dilutions de Giemsa au 10e valent mieux que les dilutions au 50e ou au 100e. Celles-ci, en raison du long espace de temps qu'elles exigent (12 à 15 heures au minimum), donnent lieu à un abondant précipité rougeâtre qui gêne la lecture des préparations. Pour les coupes, au contraire (nous détaillerons plus loin leur mode de coloration), les dilutions au 50e ou au 100e valent mieux : le précipité rougeâtre est entièrement enlevé par l'acétone au moment de la déshydratation.

C'est en pleine vitalité que les leptomonas de culture sont englobés. On se rend surtout compte de ce fait quand on a affaire à des leptomonas fixés par leur extrémité postérieure.

Le flagelle, qui est alors la dernière partie englobée, reste mobile jusqu'à complète disparition. Nous n'avons jamais constaté d'action lytique en dehors des globules blancs. Le sérum de la souris n'a d'ailleurs aucune action nocive sur les cultures de Bouton d'Orient et de Kala-Azar; par l'immunisation, on développe simplement une légère propriété agglutinative qu'on ne peut d'ailleurs affirmer que dans le cas des cultures de Bouton d'Orient, puisque le Kala-Azar donne déjà en culture de nombreux amas de microbes. Notons, en passant, que les leptomonas des cultures de Bouton d'Orient s'agglutinent de façon quelconque; ils se rapprochent les uns des autres et s'entremêlent sans disposition spéciale. On ne peut donc trouver ici confirmation de la théorie de Prowazek (1905), qui prétend qu'au cours de l'agglutination des trypanosomes en rosaces, le blépharoplaste sécrète une substance visqueuse qui tend à les réunir les uns aux autres. Si cette théorie était exacte, les leptomonas auraient tendance à se grouper par leurs extrémités antérieures.

Bref, l'immunité naturelle de la souris à l'égard des *Leishmania tropica* et *infantum*, en culture, est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. Les leptomonas, introduits dans le péritoine, sont l'objet d'une phagocytose rapide. En une 1/2 heure à 3/4 d'heure, une souris neuve se débarrasse totalement des flagellés contenus dans 1/2 cent. cube de culture arrivée au maximum de richesse.

Enfin, même en injectant de très fortes doses de culture dans le péritoine d'une souris, 2 à 3 cent. cubes par exemple, on ne constate jamais la pénétration des éléments flagellés dans le sang. La défense est victorieusement assurée par les seuls lymphocytes de la cavité péritonéale.

L'IMMUNITÉ NATURELLE DE LA SOURIS A L'ÉGARD DES CULTURES DE TRYPANOSOMES DIVERS

(*T. rotatorium* MAYER, 1843; *T. noctuæ* SCHAUDINN, 1904; *T. scardinii* BRUMPT, 1906; *T. phoxini* (1) BRUMPT, 1906; *T. Theileri* LAVERAN, 1902, et *T. vespertilionis* BATTAGLIA, 1905.)

La culture de ces divers flagellés a été faite, par nous, au laboratoire de M. MESNIL, dans le milieu de Novy-Nicolle, dont nous avons donné la formule et le mode de préparation.

Nous avons isolé le *T. rotatorium* MAYER le 8 mai 1911, d'une *Rana esculenta* L., achetée sur les quais de la Seine. La culture de ce trypanosome fut entretenue pendant 4 mois. Elle se fait très abondante du 8[e] au 10[e] jour, à la température ordinaire du laboratoire. L'isolement fut fait en ponctionnant la veine abdominale, que l'on découvre après incision et écartement de la peau. Cette veine est recouverte par une légère couche musculaire, qu'il est facile de cautériser complètement sans léser aucunement le vaisseau. A la ponction, on recueille, par aspiration, plus de 1/2 cent. cube de sang. Ce procédé nous a paru plus pratique et plus fidèle que celui de la ponction du cœur : il nous a constamment donné des succès. Nous avons inoculé aux souris des cultures de *T. rotatorium* des 5[e], 6[e], 7[e], 8[e] et 9[e] générations, faites du 5 juin au 26 juillet 1911.

Le *T. noctuæ*, avec lequel nous avons expérimenté, provient du laboratoire du professeur HARTMANN. Nous l'entretenons régulièrement depuis le 15 mai 1911. Les cultures de *T. noctuæ* sont remarquables par leur richesse.

Nous avons isolé *T. scardinii* de rotengles (*Scardinius erythrophtalmus*) provenant de l'étang de Garches. L'isolement fut pratiqué le 25 mars 1910. Ce trypanosome fut entretenu pendant plus d'un an en milieu artificiel. Nous avons inoculé aux souris des cultures provenant des 15[e], 16[e], 18[e] et 19[e] générations faites du 27 novembre 1910 au 30 janvier 1911.

(1) Nous employons les noms spécifiques créés par BRUMPT et dérivés du nom générique du poisson infecté. Mais il est très possible qu'il n'y ait pas là d'espèces distinctes du *T. Danilewskyi* LAVERAN et MESNIL de la carpe.

Nous avons isolé *T. phoxini* de vairons (*Phoxinus lœvis* Agass.) achetés sur les quais de la Seine. L'isolement, difficile en raison de la petitesse de l'animal, fut fait, pour la première fois, par nous le 29 novembre 1910. Nous avons entretenu ce trypanosome pendant 8 mois en milieu Novy-Nicolle. Nous avons inoculé aux souris des cultures provenant des 3e, 4e, 5e et 6e générations faites du 14 février au 7 mars 1911.

Nous avons isolé (1), le 15 janvier 1911, un trypanosome voisin de *T. Theileri* des bœufs d'Alfort, dans le service de M. le professeur Moussu. La première culture fut faite en bouillon simple, les suivantes en milieu Novy-Nicolle. Nous avons inoculé aux souris les cultures des 5e, 6e, 7e et 8e passages, ensemencées du 3 au 23 mars 1911 et injectées au maximum de leur croissance, vers le 7e jour.

Le *T. vespertilionis*, qui nous a servi, est dû à l'amabilité de M. Ch. Nicolle. Ce trypanosome, qui fut cultivé par nous pendant près de deux ans, est isolé depuis 1907; et à partir de ce moment, il fut sans interruption cultivé en milieu de Novy-Nicolle.

L'immunité naturelle de la souris à l'égard de ces divers flagellés est très forte. Les microbes ne pénètrent jamais dans le sang quand ils sont injectés dans le péritoine, même à haute dose. Ils sont détruits sur place, en 1/2 heure au plus. On peut se faire une idée très exacte de la rapidité de destruction en mélangeant sur lame une goutte de culture et une goutte de liquide péritonéal d'une souris neuve. Très rapidement, les *Crithidia* et les trypanosomes de culture sont la proie des mononucléaires (2). Fixés généralement par leur extrémité postérieure, on peut, en 3 à 4 minutes, assister à leur englobement complet. Les flagelles, dernière partie englobée, restent mobiles jusqu'à la fin, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils soient entièrement pris par les deux minces pseudopodes du leucocyte. C'est donc en pleine vitalité que les flagellés des cultures sont détruits. La phagocytose est le seul mode de destruction des parasites, et il est très facile de s'en assurer.

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, séance du 11 octobre 1911, t. IV, n° 8.

(2) Les polynucléaires sont susceptibles, mais dans une très faible mesure, de jouer le rôle de phagocytes.

L'IMMUNITÉ DE LA SOURIS A L'ÉGARD DE T. LEWISI KENT, 1881.

A. — Immunité naturelle. Son mécanisme.

Les souris sont, en général, réfractaires au *T. Lewisi*. Le fait est classique.

Nous avons vu que les flagellés de diverses cultures de protozoaires sont très rapidement phagocytés *in vivo* comme *in vitro* par les leucocytes de la souris.

Avec le *T. Lewisi*, il n'en va pas de même. *In vitro*, le mélange de sang trypanosomé et de liquide péritonéal n'est pas suivi de phagocytose.

Chez le vivant, l'injection des trypanosomes dans le péritoine est suivie d'une phase latente, de durée variable, pendant laquelle les flagellés, non seulement se conservent, mais peuvent se multiplier, ce qu'atteste la présence de petites formes et de rosaces à 4 ou 5 éléments au plus. Levaditi et Sevin, nous l'avons vu, ont constaté un fait analogue chez les calfats naturellement réfractaires au *T. paddæ*.

Les trypanosomes peuvent, en partie, facilement pénétrer du péritoine dans le sang. Après une forte inoculation (1/2 à 1 cent. cube de sang trypanosomé), déjà 20 minutes à 1/2 heure après, on peut se rendre compte de cette pénétration : en examinant une goutte de sang prise à la queue, on y constate de rares trypanosomes. Ceux-ci augmentent de nombre pendant plusieurs heures (4 à 5 en moyenne), puis leur nombre décroît lentement. Les trypanosomes cessent d'être visibles dans le sang plus rapidement que dans le péritoine. La disparition totale des parasites a lieu entre 36 et 48 heures. Laveran et Mesnil, avant nous, ont, à ce sujet, fait des constatations analogues. « Après avoir injecté, disent-ils, du sang riche en trypanosomes dans le péritoine des souris blanches, nous avons vu que les trypanosomes se retrouvaient dans le péritoine et dans le sang après 24 heures; au bout de 48 heures, ils avaient toujours disparu (1). »

(1) *Loc. cit.*

Lorsqu'on inocule une dose faible, 1 à 2 gouttes de sang, pour se rendre compte de la présence des trypanosomes dans le torrent circulatoire, il faut sacrifier les souris, aspirer le sang du cœur et le centrifuger : on trouvera des trypanosomes dans le culot de centrifugation.

Bref, que l'on injecte une dose forte ou faible, la pénétration des trypanosomes dans le sang a toujours lieu ; de telle sorte que, pour résoudre le problème de l'immunité naturelle de la souris, il faut se demander ce que devient le *T. Lewisi*, non seulement dans le péritoine, mais encore dans les viscères.

Lorsqu'on ponctionne, à intervalles rapprochés, le péritoine d'une souris inoculée, on constate très nettement, lors des deux ou trois premières ponctions, que les trypanosomes sont tous ou presque tous entièrement libres et dans un parfait état d'intégrité. Roudsky (1) a vu, à l'état frais, des mononucléaires de souris phagocyter des trypanosomes, et cela par le même processus que Laveran et Mesnil ont fait connaître chez le rat immunisé et chez le cobaye. Nous avons, de notre côté, fait semblable constatation. Mais il faut ajouter que la phagocytose se constate rarement. Et c'est bien là qu'est la difficulté du problème. Le plus souvent, on n'observe que des trypanosomes fixés par leur extrémité postérieure sur les leucocytes. Ceux-ci ne réagissent pas à l'attachement des protozoaires et l'on peut, pendant des heures, observer des trypanosomes piqués sur des mononucléaires, sans que la moindre réaction se manifeste de la part du globule blanc. Les leucocytes de la souris, placés entre la lame et la lamelle, *à la température du laboratoire*, se trouvent dans des conditions très désavantageuses pour phagocyter le *T. Lewisi*. Nous avons vu qu'il en était tout autrement avec les flagellés des cultures. Pour que la phagocytose du *Lewisi* puisse se faire *in vitro*, il faut qu'elle débute dans le péritoine et qu'elle soit déjà en partie faite. De là, sans aucun doute, la difficulté que l'on éprouve à la constater. Comme l'acte phagocytaire est difficilement visible, dans l'espoir de mieux le rencontrer, nous n'avons pas hésité, ainsi que l'a fait Massaglia chez le cobaye, à multiplier les ponctions péritonéales. A partir d'un nombre de ponctions, variable suivant les souris, nous

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 6 mai 1911, t. LXX, p. 693.

avons constaté la présence de trypanosomes détruits en dehors des leucocytes. Dès lors, il fallait se demander si la disparition des parasites est due à la phagocytose ou à l'action trypanolytique du liquide péritonéal, ou encore à ces deux processus réunis. Après de nombreuses recherches, nous avons la conviction que la phagocytose est le seul processus normal de destruction des trypanosomes. Par la répétition des ponctions, on met le péritoine dans un véritable état pathologique. On sait bien aujourd'hui qu'il suffit d'une simple piqûre de la paroi abdominale pour amener, durant plusieurs heures, une leucopénie plus ou moins manifeste, sur le déterminisme de laquelle on ne s'entend pas d'ailleurs pas.

Pour les uns, du fait seul de la piqûre, il y a destruction d'un nombre plus ou moins considérable de leucocytes; pour les autres, la piqûre amène la transformation du fibrinogène du liquide péritonéal en fibrine; le réseau de fibrine, en se constituant, enserrerait dans ses mailles plus ou moins de leucocytes. Quoi qu'il en soit, il paraît établi que toute piqûre de la paroi du ventre, si minime soit-elle, surtout chez un animal aussi petit que la souris, peut entraîner des lésions appréciables. Nous pensons que celles-ci sont constituées, pour une grande part, par des altérations leucocytaires. Nous avons, en effet, constaté sur les frottis de liquide péritonéal, prélevé après plusieurs piqûres abdominales, des leucocytes avec des noyaux en karyolyse, réduits à l'état de boules régulières, mais d'inégale grosseur, répandues dans le cytoplasme : témoignage histologique indéniable de la souffrance du péritoine. Grâce aux altérations des leucocytes, les substances trypanolytiques contenues dans les phagocytes diffusent dans le liquide péritonéal. Cette hypothèse se renforce du fait que nous avons assisté *in vitro* à la destruction extracellulaire des trypanosomes. En voici, entre plusieurs autres, un exemple des plus convaincants : le 22 mars 1911, nous inoculons, dans le péritoine d'une souris neuve, de 20 grammes, un centimètre cube de sang citraté d'un jeune rat très fortement infecté. Treize heures après, le sang de la souris contient quinze à vingt parasites par champ (oculaire compensateur n° 4, objectif Stiassnie n° 5). Nous en mettons une goutte entre lame et lamelle que nous lutons à la paraffine. Nous traitons de même

une goutte de liquide péritonéal de ponction. Les trypanosomes, sitôt qu'ils viennent d'être retirés de l'organisme, sont tous, sans exception, très mobiles. Les préparations, de contrôle, au Giemsa, montrent que les trypanosomes sont en parfait état d'intégrité. Au bout de dix minutes, manifestement au bout d'un quart d'heure, alors que les flagellés contenus dans la goutte de sang conservent leur aspect normal, les trypanosomes contenus dans le liquide péritonéal montrent des altérations de plus en plus accentuées. Celles-ci débutent à certains endroits de la préparation; puis, elles s'étendent et se généralisent. C'est d'abord une paralysie notable du trypanosome; le flagelle et la membrane ondulante se mouvant si paresseusement qu'il devient incapable de se déplacer. Finalement, c'est l'immobilité complète. Alors, le protoplasme devient clair, vitreux; il montre des vacuoles d'inégale grosseur, de plus en plus nombreuses. Le contour du trypanosome finit par ne plus être reconnaissable; on ne voit plus que le flagelle auquel adhère le blépharoplaste. Bref, le trypanosome a littéralement fondu, en l'espace de quinze à vingt minutes, sous l'œil qui l'observait. La destruction des trypanosomes s'échelonne pendant plusieurs heures. Au bout de six heures, presque tous les trypanosomes sont détruits. Les trypanosomes, contenus dans la goutte de sang, gardent, au contraire, leur intégrité première. Roudsky (1) a observé, de son côté, que « le sérum sanguin de la souris blanche constitue un milieu favorable pour la conservation *in vitro* du *T. Lewisi* ».

Ainsi, en conservant, entre lame et lamelle, le liquide péritonéal de souris infectées, les trypanosomes, très mobiles au sortir de l'organisme, peuvent se détruire complètement en l'espace de quelques heures et se réduire à l'appareil flagellaire.

Il faut, en conséquence, se résigner à ne ponctionner qu'une fois le péritoine des souris et à faire, sitôt après la prise, des frottis avec le liquide péritonéal de ponction. Le seul inconvénient de cette technique est de multiplier beaucoup le nombre des animaux mis en expérience. On devra également ne tenir

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie,* séance du 12 mars 1910.

compte que des préparations d'une parfaite coloration : de la sorte, on constate que les trypanosomes retirés des péritoines des souris, quel que soit le moment de la ponction, sont en parfaite intégrité. Par contre, sur ces mêmes frottis, on rencontre, par lame, deux ou trois figures indéniables de phagocytose.

Il est probable que la digestion des trypanosomes se fait très vite; la digestion du protoplasme serait très rapide, car, avec la plupart des auteurs, nous n'avons que très rarement observé dans les leucocytes des trypanosomes renflés en boule à l'intérieur de vacuoles digestives. Nous avons seulement vu, plongeant en plein cytoplasme cellulaire et tranchant vigoureusement par contraste de coloration, le noyau et le blépharoplaste. Fréquemment, le blépharoplaste existe seul. Ailleurs, nous avons observé dans les leucocytes des enclaves ayant la réaction de la chromatine nucléaire; sont-ce des restes de trypanosomes digérés?

Nous avons aussi recherché la destinée des trypanosomes dans les viscères. Nous fûmes obligé, dans ce but, d'inoculer aux souris une forte proportion de virus (au moins 1/2 cent. cube de sang; la plupart du temps, 1 à 2 cent. cubes de sang). Avec les doses faibles (1 à 2 gouttes), la quantité de trypanosomes qui passent dans la circulation est si faible, qu'il serait puéril de vouloir les rechercher sur les coupes. Nos recherches, tant par la méthode des frottis que par celle des coupes, ont porté principalement sur la rate, le foie, les poumons, les ganglions lombaires, la moelle osseuse ; accessoirement, sur l'épiploon et la paroi abdominale fixée en pleine épaisseur musculaire. Les souris étaient tuées au chloroforme ou asphyxiées au gaz d'éclairage.

D'une manière générale, au point de vue de la coloration des trypanosomes, les frottis nous ont donné des résultats bien supérieurs à ceux des coupes. Nous n'avons pas réussi à différencier le flagelle des trypanosomes contenus dans les coupes. Par contre, nous avons coloré avec une grande netteté le corps même du trypanosome ainsi que les noyau et blépharoplaste : le cytoplasme apparaît en bleu délicat, très finement alvéolaire; le noyau en rouge; le blépharoplaste en violet foncé.

La méthode que nous avons employée pour la fixation et la

coloration des coupes est à peu près celle qu'a fait connaître dernièrement GIEMSA (1). Comme fixateur, le sublimé hydro-alcoolique acétique de SCHAUDINN et PROWAZEK :

Solution saturée aqueuse de sublimé . . . . . . 2 parties.
Alcool absolu ou à 95 degrés. . . . . 1 partie.
Acide acétique pur, 1 p. 100 du total.

Suivant les conseils donnés par M. BORREL dans ses Cours, c'est à la glacière, à une température voisine de 0 degré, que nous avons fait nos fixations. Comparativement, les fixations faites à basse température nous ont paru supérieures à celles faites à la température du laboratoire. Suivant la grosseur des pièces, le temps de la fixation varie de 5 à 12 heures. Les poumons ont été fixés *in toto*, suivant l'excellente pratique préconisée par M. BORREL (2), la trachée est liée avant que d'ouvrir le thorax. Puis, tout l'arbre pulmonaire est enlevé d'un bloc, plongé à même le fixateur et recouvert d'une couche d'ouate hydrophile suffisante pour empêcher les poumons de flotter. Au bout de 5 à 6 heures, pour faciliter la pénétration du fixateur, on pratique au bistouri des incisions dans les poumons. Au bout de 12 heures, la fixation est faite.

La ligature de la trachée avant l'ouverture du thorax a pour but de fixer le poumon en extension physiologique. Sans cette précaution, les alvéoles s'affaissent parfois, si bien que les coupes deviennent absolument illisibles. Avec des alvéoles moyennement distendues, les coupes de poumons apparaissent comme une dentelle bien ajourée, et il devient très simple de s'y retrouver.

Au sortir du fixateur, afin d'être bien certain d'enlever tout le sublimé, les fragments d'organes sont plongés pendant trois jours dans l'alcool à 70° iodé. Puis, on les fait passer par la série classique : alcool à 80 degrés, 24 heures; alcool à 95 degrés, 24 heures; alcool à 100 degrés, 12 heures; xylol, 12 heures; xylol-paraffine, 12 heures; paraffine, 12 heures. Les coupes sont débitées à 6 μ et colorées au Giemsa en solution faible : 1 goutte pour 2-5 cent. cubes d'eau distillée.

(1) *Deutsche mediz. Woch.*, 1910, n° 12.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII, p. 593.

Laisser agir trente-six à quarante-huit heures, et renouveler le bain colorant au bout de vingt-quatre heures. La déshydratation, après lavage à l'eau courante, a lieu dans des mélanges, à proportions variables, d'acétone et de xylol. Il est pratique de mettre ces mélanges dans des tubes Borrel étiquetés 1, 2, 3 et 4, et de porter les lames successivement du tube 1 au tube 4.

Les mélanges contenus dans les tubes sont les suivants :

Tube I. —	Acétone	95	cent. cubes.
	Xylol	5	—
Tube II. —	Acétone	70	—
	Xylol	30	—
Tube III. —	Acétone	30	—
	Xylol	70	—
Tube IV. —	Xylol pur.		

Après passage dans le tube 4, il ne reste plus qu'à monter au baume.

D'après S.-B. Wolback et S.-H. Mc Kee, l'addition de colophane à l'acétone (20 p. 100 de colophane) empêcherait la décoloration de l'éosine. Nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats en appliquant ce procédé (1).

Nous devons tout de suite dire que, sur les nombreuses coupes que nous avons pratiquées, nous n'avons pas trouvé une seule figure histologique susceptible d'être interprétée nettement comme le résultat de la phagocytose. Nous avons simplement rencontré dans les phagocytes des enclaves analogues à celles des leucocytes du péritoine. Par contre, nous avons constaté avec la dernière netteté que les trypanosomes contenus dans les viscères, et notamment dans la rate (2), sont en parfait état d'intégrité, ce qui rend très improbable leur destruction par trypanolyse.

Il nous est arrivé à maintes reprises de voir des trypanosomes piqués sur les leucocytes et à divers stades de phagocytose sur des frottis de rate et de ne rien constater de sem-

(1) *Journ. of med. Res.*, t. XXIV, n° 2, avril 1911.

(2) Quand on examine, entre lame et lamelle, un fragment de rate trypanosomée disséquée dans de l'eau physiologique, il passe dans le champ du microscope une série de formes bizarres que l'on pourrait prendre pour des trypanosomes altérés et qui ne sont en réalité que des amas d'hématoblastes. Aussi ne doit-on faire confiance qu'aux préparations colorées.

blable sur les coupes. Ce résultat s'explique par l'imparfaite coloration des trypanosomes autant que par le trop grand tassement des éléments cellulaires dans les coupes. Du fait de la compression des leucocytes, il y a une réelle impossibilité à dire si les trypanosomes sont à l'intérieur des leucocytes ou simplement à côté d'eux, étant donné que le cytoplasme du phagocyte et celui du trypanosome se colorent dans le même ton, en bleu plus ou moins foncé. Les trypanosomes, dans la rate, se rencontrent au niveau de la pulpe splénique et surtout au niveau des sinus veineux. Nous n'avons pas noté leur présence au niveau des corpuscules de Malpighi.

Une lésion est constante au niveau du foie : l'hyperplasie des cellules de Kupffer. Celle-ci peut présenter tous les degrés. Tantôt, elle se limite au simple boursouflement du noyau; tantôt, c'est toute la cellule qui est tuméfiée, allongée en un long fuseau, parallèlement au vaisseau. Il est probable que les cellules de Kupffer en hyperplasie abandonnent la paroi des capillaires, car ceux-ci peuvent être dénudés sur un parcours plus ou moins long. L'endothélium des capillaires hépatiques joue vraisemblablement un rôle actif dans la phagocytose des trypanosomes. Il nous est cependant impossible d'en fixer exactement l'importance, car nous n'avons trouvé dans le cytoplasme des cellules endothéliales que des fragments irréguliers, ayant les réactions de la chromatine et qu'on ne pouvait qu'hypothétiquement rapporter à des trypanosomes dégénérés.

Les capillaires hépatiques des souris infectées sont plus riches en globules blancs que normalement. On y rencontre peu de lymphocytes, surtout des mononucléaires gros et moyens et quelques mastzellen. Le cytoplasme des mononucléaires des capillaires contient fréquemment des enclaves chromatiques.

L'abondance des trypanosomes dans les vaisseaux du poumon contraste singulièrement avec leur rareté dans les vaisseaux des autres viscères. Cela est, sans doute, dû à ce que les poumons sont, dans un temps donné, traversés par une quantité de sang infiniment plus grande que celle qui traverse les autres organes. Nous avons facilement trouvé des trypanosomes jusque dans les fins capillaires, à peine plus larges

qu'un globule rouge, qui rampent à la surface des alvéoles. Ces trypanosomes n'étaient séparés de la lumière alvéolaire que par la couche endothéliale limitante. Nous n'avons jamais constaté la pénétration des trypanosomes dans l'intérieur des alvéoles. *L'endothélium alvéolaire ne joue donc aucun rôle dans la destruction de T. Lewisi.* Nous rappelons, par comparaison, que SAUERBECK a constaté la pénétration de *T. Brucei* dans les alvéoles des poumons du rat, et la phagocytose de ce trypanosome par l'endothélium alvéolaire.

Le tassement des éléments lymphatiques est tel au niveau des ganglions lombaires qu'on ne peut avoir aucun renseignement utile de l'examen de la couche corticale et du système caverneux. Le tissu sous-capsulaire donne seul des renseignements utiles : à son niveau, les cellules lymphatiques sont écartées les unes des autres et les trypanosomes peuvent facilement être mis en évidence. On note leur intégrité parfaite. On trouve également des trypanosomes en parfait état dans les fins capillaires du tissu graisseux qui entoure incomplètement la capsule du ganglion.

La moelle osseuse des fémurs et des tibias n'a été examinée qu'en frottis. Elle contient de rares trypanosomes, tous intacts.

La phagocytose doit être accentuée au niveau de l'épiploon, à la surface duquel nous avons rencontré, dans un réseau de fibrine, un grand nombre de leucocytes parfois littéralement bourrés d'inclusions chromatiques.

En somme, les coupes renseignent sur la distribution topographique des trypanosomes dans les viscères et l'existence dans les leucocytes de nombreuses inclusions chromatiques qui sont vraisemblablement des trypanosomes en voie de digestion. En plus, elles montrent très nettement l'absence de trypanolyse en dehors des globules blancs.

B. — SOURIS RÉCEPTIVES.

MÉCANISME DE LA GUÉRISON. IMMUNITÉ ACTIVE ET PASSIVE.

Il était classique d'admettre jusqu'ici que la souris est réfractaire au *T. Lewisi*. En modifiant expérimentalement ce virus, et, pour employer l'expression de MM. LAVERAN et PETTIT, en le

« renforçant », Roudsky, le premier, a pu inoculer en série des souris (1). Il déclare d'ailleurs, avec les auteurs, que cet animal est réfractaire non seulement au virus normal, mais encore aux cultures de celui-ci.

Les faits que nous apportons corroborent les données de Roudsky en les élargissant, si on peut ainsi dire. Nous avons pu, en effet, à notre grande surprise, infecter d'emblée des souris avec le *Lewisi* normal, tel qu'on le trouve soit chez un rat d'égout (infection spontanée), soit chez un rat blanc ou pie (infection expérimentale), soit encore dans les cultures (2).

Les souris ont été infectées par inoculation d'une simple goutte de sang prise à la queue d'un rat, soit au moment de la période d'état de l'infection sanguine, soit à celle de la multiplication des parasites. On peut, au lieu de sang, se servir du liquide péritonéal d'un jeune rat récemment inoculé. Le pourcentage des résultats positifs n'est pas plus élevé quand on se sert d'un sang riche en formes de multiplication. Les souris de 7 à 8 grammes ne sont pas plus sensibles que les souris de 15 à 20 grammes.

Nos expériences ont été faites avec 3 origines différentes de *Lewisi*, que nous numérotons 1, 2 et 3. Les *Lewisi* 2 et 3 ont été isolés par nous de rats d'égout. En faisant des inoculations péritonéales à l'aide d'une goutte de sang de rat infecté, sur 26 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 1, nous avons eu 6 résultats positifs; sur 10 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 2, 4 succès; et sur 42 *souris* inoculées avec le *Lewisi* 3, seulement 5 succès. On peut, de ces 3 séries d'expériences, conclure que les différentes races de *Lewisi* ne sont pas également inoculables d'emblée à la souris; elle peut être complètement réfractaire à certaines races.

La souris peut également être infectée par la voie sous-

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 5 et 12 mars 1910, 12 novembre 1910; et *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 5 janvier 1911.

(2) Nous avons, pour la première fois, signalé dans les cultures de *T. Lewisi* de petits trypanosomes qui, après fixation humide aux vapeurs osmiques et coloration lente au Giemsa, ont, en moyenne, 7 μ 8 de long sur 1 μ 7 de large. Le blépharoplaste fait souvent saillie tout à l'extrémité postérieure du parasite. Ces petits trypanosomes de culture ressemblent beaucoup aux « small trypanosomes » signalés par Swellengrebel et Strickland dans l'intestin de la puce du rat, *Ceratophyllus fasciatus* Bosc. Consulter à ce sujet la note que nous avons fait paraître à la *Société de Biologie*, séance du 6 mai 1911, p. 804, t. LXX.

cutanée, qui est aussi bonne que la voie péritonéale. Nos injections, pour la plupart, par simple commodité d'étude, ont été faites dans le péritoine.

Nous avons pu infecter des souris en leur inoculant des cultures faites en Novy-Nicolle. Nous avons constamment eu un pourcentage de résultats positifs plus élevé avec les cultures qu'avec le sang du rat. Et cette différence, très certainement, ne tient pas à ce que la dose de culture contenait plus de parasites que celle du sang; car, on n'a pas de résultats meilleurs en inoculant à des souris de fortes doses de virus; l'immunité naturelle, quand elle existe, est, en effet, une immunité très solide, que l'on ne peut faire fléchir en injectant de grandes quantités de trypanosomes. Alors que, sur 26 souris inoculées dans le péritoine avec une goutte de sang à *Lewisi* 1, 6 seulement prennent la maladie, sur 23 souris inoculées dans le péritoine avec des cultures de ce virus, 11 s'infectent. De même, sur 42 souris inoculées avec du sang à *Lewisi* 2, 5 succès; et sur 19 souris inoculées avec les cultures de ce virus, 10 succès. Il faut en conclure que *T. Lewisi* en culture perd un peu de sa spécificité étroite pour le rat, et que, de ce fait, il peut mieux infecter la souris. Rappelons, à ce sujet, que Roudsky, dans la première note qu'il a communiquée, indiquait comme idée directrice d'élucider l'influence des passages en milieux de culture sur l'évolution de *T. Lewisi*.

Il nous a semblé que la maladie n'évolue pas chez la souris avec cette régularité ponctuelle que Laveran et Mesnil ont fait connaître chez le jeune rat. L'infection du sang se fait soit en même temps, soit après celle du péritoine. La durée de la maladie est très inégale : en moyene, 15 jours; maximum, 24 jours; minimum, 4 à 5 jours. La disparition des parasites a parfois lieu brusquement; bien plus souvent, elle se fait lentement, progressivement, durant 2 à 3 jours. Les formes de multiplication dans le péritoine et dans le sang sont absolument identiques à celles du rat. A noter dans certains cas la présence, seulement durant la phase de multiplication des parasites, de trypanosomes sans flagelle libre, quoique avec une membrane ondulante bien développée, et surtout de formes à blépharoplaste seul, sans noyau, et qui, à la coloration, nous paraissaient être en parfaite intégrité. Ces formes à

blépharoplaste seul sont toujours très rares, au nombre de 4 ou 5 au plus sur un frottis. Nous avons dernièrement constaté la présence de formes à blépharoplaste seul dans le sang de jeunes rats, pesant 15 grammes, inoculés depuis 5 à 8 jours, en pleine période de multiplication sanguine des parasites.

A la période d'état de l'infection, les trypanosomes, chez la souris comme chez le rat, sont d'une régularité parfaite.

Il est plutôt exceptionnel que l'infection de la souris soit légère. Le plus souvent, il y abondante multiplication des parasites. Notamment, les rosaces sont, dans le sang, quelquefois si nombreuses qu'on peut en rencontrer avec un objectif 5, jusqu'à 7 à 8 dans un champ microscopique. L'infection trypanosomienne peut, ainsi que l'a signalé Roudsky, entraîner la mort. Nous avons observé celle-ci 2 fois sur 233 cas, dont 55 positifs. La multiplication des parasites dans ces 2 cas mortels a duré jusqu'à la mort, survenue 3 et 5 jours après l'inoculation. Le sang était si riche en parasites qu'il était manifestement décoloré, comme un liquide rosé. Aucune bactérie, aérobie ou anaérobie, n'a cultivé. Une fois sur deux, la mort est survenue brusquement, comme chez un rat nagané.

A vrai dire, nous avons observé la mort 5 fois. Seulement, dans 3 cas, le sang des souris mortes nous a fourni sur gélose simple une abondante culture microbienne. En conséquence, nous n'avons pas cru devoir attribuer ces 3 décès à l'infection trypanosomienne.

Comme lésions anatomo-pathologiques macroscopiques, chez les deux souris dont la mort a pu être avec vraisemblance imputée au *T. Lewisi*, nous avons observé une dégénérescence granulo-graisseuse accentuée du foie. Les veines intralobulaires apparaissent sous forme de taches rouge foncé, irrégulièrement arrondies, entourées du tissu lobulaire jaune pâle. La rate était grosse, violacée, très congestionnée. Les reins étaient normaux. Chez une souris, nous avons noté un léger œdème du poumon avec de rares ecchymoses.

A l'examen microscopique, nous avons observé une atteinte profonde de la cellule hépatique. Les cordons de Remak, comprimés par la dilatation des capillaires, étaient partiellement détruits. Dans les capillaires, nous avons noté une accumulation considérable de leucocytes, formés en majeure partie de

mononucléaires (moyens et gros) et de plasmazellen; pas de mastzellen, pas d'hématies nucléées.

A. Pettit (1) a montré que, dans diverses trypanosomiases expérimentales, le foie subit, du fait de l'accumulation de leucocytes, formant manchon autour des vaisseaux hépatiques, une véritable transformation lymphoïde. D. Roudsky (2) a observé la même lésion chez les souris inoculées avec le *T. Lewisi* Kent *renforcé*. Nous n'avons rien constaté de semblable chez les deux souris mortes d'infection trypanosomienne et chez les souris en cours d'infection. L'accumulation des leucocytes a lieu simplement dans les capillaires.

La transformation lymphoïde du foie telle que l'a observée Roudsky semble donc bien, ainsi que l'affirme A. Pettit, répondre à une propriété nouvelle acquise par le *T. Lewisi* Kent *renforcé*.

Nous ajouterons que les tout jeunes rats inoculés avec le *T. Lewisi* normal ne présentent pas la transformation lymphoïde du foie, *même quand ils succombent à l'infection trypanosomienne*. Nous en avons observé dernièrement 1 cas très net. Un jeune rat de 15 grammes, inoculé de sang trypanosomé le 9 octobre, meurt le 30 du mois. A l'autopsie, nous notons une transformation granulo-graisseuse accentuée du foie, avec teinte jaune manifeste, mais sans trace aucune de transformation lymphoïde.

Avec le *Lewisi n°* 1, nous n'avons pas réussi les passages en série de souris à souris. Du moins, avons-nous subi des échecs répétés. Nous avons groupé sous forme de tableau les différents résultats que nous avons obtenus.

La guérison survient chez les souris réceptives par phagocytose. Celle-ci, comme chez les souris qui ont d'emblée l'immunité naturelle, est difficile à constater lorsqu'on examine, entre lame et lamelle, le liquide péritonéal de ponction. Les meilleurs renseignements sont fournis par les frottis colorés,

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, séance du 4 février 1911, t. LXX, p. 165, et *Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, fasc. 3-4, vol. XXI.

(2) *Loc. cit.*

sur lesquels on peut rencontrer de bonnes figures de phagocytose. Les coupes ne donnent rien de particulier; des inclusions chromatiques dans les mononucléaires de la rate, des poumons, du foie, dans les cellules de Kupffer hyperplasiées.

SÉRIES	NOMBRE DE SOURIS				NOMBRE DE SOURIS INFECTÉES			
	Du 1er passage.	Du 2e passage.	Du 3e passage.	Du 4e passage.	Lors du 1er passage.	Lors du 2e passage.	Lors du 3e passage.	Lors du 4e passage.
Ire série.	10	6	»	»	4	0	»	»
IIe série.	6	6	»	»	1	0	»	»
IIIe série.	3	1	»	»	2	1	»	»
IVe série.	4	4	6	»	2	2	0	»
Ve série.	6	4	5	5	3	1	2	0
VIe série.	6	12	»	»	1	0	»	»

Les souris qui ont eu une première infection sont toujours réfractaires à une seconde inoculation, quelle que soit la dose de trypanosomes inoculée dans le péritoine. La souris, comme le rat, est donc susceptible de s'immuniser activement à l'égard du *T. Lewisi.*

Nous avons constamment observé que les trypanosomes passent dans le sang lors de la 2e inoculation. Le fait est plus rare lors de la 3e inoculation. La 4e inoculation n'est jamais suivie d'infection sanguine : les parasites sont alors détruits dans la cavité péritonéale même.

Nous avons immunisé nos souris par injection de sang trypanosomé de rat ou de souris. Avec le sang de rat, il faut aller avec prudence et se contenter d'inoculer 1 à 2 gouttes. Les doses plus fortes sont mal supportées, et souvent les souris meurent vers la 6e et 7e réinoculation. Il vaut mieux injecter du sang de souris infectée. On n'a pas alors à craindre l'effet

toxique des injections et la phagocytose des globules rouges ne vient pas compliquer celle des trypanosomes. On peut encore immuniser des souris avec du sang de souris, puis au moment où l'on désire étudier le mécanisme de l'immunisation active, inoculer du sang de rat. La destruction des globules rouges du rat est alors tardive, celle des trypanosomes précoce. Les deux phénomènes se succèdent, et on peut les étudier l'un après l'autre.

La plupart de nos recherches sur l'immunité active ont été faites sur des souris qui avaient reçu au minimum 4 à 5 injections.

La première chose qui frappe chez une souris en immunité active est l'agglutination des trypanosomes. Celle-ci a lieu dès que l'injection est faite. Au bout de 2 à 3 minutes, on assiste à la formation de gros amas de trypanosomes, affectant ou non la forme de rosaces. Les trypanosomes, et cela dépend de l'importance du traitement que l'on a fait subir à l'animal, peuvent être simplement agglutinés, et alors à cause de leur mobilité persistante ils se disposent en rosaces (Laveran et Mesnil), ou à la fois agglutinés et paralysés. La paralysie n'est d'ailleurs jamais totale. Chez les souris qui ont reçu près de 20 injections, les trypanosomes conservent encore quelques mouvements de la membrane ondulante et du flagelle. *Nous n'avons jamais observé la lyse des trypanosomes en dehors des éléments cellulaires.* L'immunité active de la souris, si poussée soit-elle, fait donc apparaître simplement la propriété agglutinante, jointe ou non à la propriété paralysante.

La destruction des trypanosomes, par phagocytose, chez les souris en immunité active, est facile à observer. La phagocytose est précoce. Déjà 2 à 3 minutes après l'injection, elle est manifeste. Elle est au maximum au bout de 10 à 20 minutes. On voit alors de gros amas de leucocytes, au milieu ou sur le pourtour desquels se rencontrent de nombreux trypanosomes à divers stades d'englobement. Les préparations colorées donnent souvent des déceptions : les amas de leucocytes et de trypanosomes sont si épais qu'ils prennent la coloration d'une manière très intense, et il est alors impossible de les utiliser. Les meilleurs renseignements sont fournis par des leucocytes isolés, ou par les petits amas de leucocytes. On peut

alors étudier tous les stades de la phagocytose, depuis le simple attachement jusqu'à la présence dans le cytoplasme des noyaux et des blépharoplastes, ainsi que de simples enclaves chromatiques.

Nous avons injecté à des souris en immunité active des trypanosomes du sang de rat et de souris, débarrassés par centrifugation des globules rouges et lavés deux fois à l'eau physiologique, ces différentes manipulations ne demandant pas plus d'un 1/4 d'heure à 20 minutes. Nous avons, dans ce cas, constaté très nettement non seulement la phagocytose, mais aussi la destruction extra-cellulaire d'une partie des flagellés. Nous pensons que la centrifugation, si ménagée soit-elle, amène de graves altérations chez beaucoup de flagellés. Certains seraient même, de ce fait, complètement détruits, réduits au flagelle et au blépharoplaste ainsi que l'attestent les frottis du culot de centrifugation colorés au Giemsa. On comprend, étant donné le trouble apporté dans l'équilibre leucocytaire par la piqûre abdominale, que les trypanosomes, en voie d'altération grave, puissent continuer à se détruire avant même que la phagocytose se produise.

Quand nous avons étudié l'immunité naturelle, nous avons montré quelles précautions il fallait prendre à l'égard de la ponction du péritoine. Ici, c'est en quelque sorte l'envers de la médaille; et les expériences, rapportées plus haut, montrent quelles précautions il faut prendre vis-à-vis des trypanosomes que l'on injecte.

Pour manifester l'immunité passive, nous avons injecté à des souris neuves d'abord le sérum immunisant (sérum de rat ou de souris) et, 2 à 3 minutes après, le sang trypanosomé (sang de rat ou de souris). Il n'y a aucun inconvénient à injecter les trypanosomes d'abord, le sérum ensuite. Cette technique est préférable à celle qui consiste à injecter en même temps sérum et trypanosomes, mélangés *in vitro*. On évite ainsi la formation de trop gros amas de trypanosomes dus à l'action agglutinante du sérum.

L'immunité passive est exclusivement d'ordre phagocytaire. Ce phénomène saute aux yeux, tout autant que l'agglutination des trypanosomes, quand on inocule une dose forte d'un sérum

immunisant très actif (2 cent. cubes de sérum pour 4 à 5 gouttes de sang trypanosomé). Très rapidement, au bout de 2 à 3 minutes, on constate, par ponction du péritoine, qu'un grand nombre de trypanosomes, demeurés parfaitement mobiles malgré l'action agglutinante, sont piqués sur les leucocytes par leur extrémité postérieure. Les trypanosomes, une fois piqués, ne se maintiennent pas en position plus ou moins perpendiculaire par rapport au leucocyte. Ils sont comme attirés invinciblement vers lui, si bien que tout le corps du flagellé arrive en contact avec le leucocyte. Nous avons pu voir ainsi des amas de 3 ou 4 leucocytes entièrement cernés par une véritable couronne de trypanosomes. Ceux-ci gardent toute leur mobilité. Ils se déplacent, comme en glissant, à la surface des leucocytes sans cependant pouvoir s'en détacher. Pour constater l'englobement du parasite entre lame et lamelle, nous répétons ici ce que nous avons déjà dit : il faut que cet englobement commence dans le péritoine. Il s'achève alors *in vitro*, mais il ne peut se faire intégralement entre lame et lamelle, du moins à la température du laboratoire.

Les leucocytes augmentent rapidement de nombre. Au bout de 20 à 25 minutes, ils forment de gros amas en marge desquels on reconnaît facilement la phagocytose à tous les stades. Les trypanosomes sont détruits en pleine vitalité. Leur disparition est plus ou moins rapide, suivant la quantité de sérum injectée. Avec une dose de sérum faible, égale à celle du sang, on retrouve des trypanosomes vivants et très mobiles 12 à 15 heures après. Avec une dose de sérum forte, en moins de 2 heures, tous les parasites sont détruits.

CONCLUSIONS

Nous pouvons résumer ainsi l'ensemble de notre travail :

1° L'immunité naturelle de la souris à l'égard des cultures de *Leishmania tropica* Wright, de *Leishmania infantum* Ch. Nicolle; de *T. rotatorium* Mayer; de *T. noctuæ* Schaudinn; de *T. scardinii* Brumpt; de *T. phoxini* Brumpt; de *T. Theileri* Laveran et de *T. vespertilionis* Battaglia, est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. Les flagellés de culture

sont détruits sitôt qu'ils sont injectés dans le péritoine, et leur disparition est très rapide;

2° L'immunité naturelle de la souris à l'égard des cultures de *T. Lewisi* Kent est une immunité d'ordre exclusivement phagocytaire. La défense, dans ce cas, n'a pas seulement lieu dans le péritoine, mais aussi dans tout l'organisme. Dans le péritoine, la phagocytose se fait durant 36 à 48 heures. Elle s'effectue par étapes successives. De là, une réelle difficulté à la manifester. Dans les viscères, les parasites sont très rapidement détruits, si bien qu'on ne les retrouve plus dans les phagocytes qu'à l'état de vestiges tout à fait méconnaissables. Les coupes montrent nettement l'absence de trypanolyse en dehors des globules blancs, ce qui nous porte à considérer la phagocytose comme le seul mode de destruction des parasites;

3° Certaines souris sont susceptibles de s'infecter par le *T. Lewisi* Kent normal. Le pourcentage des souris infectées nous a paru plus élevé quand les inoculations étaient faites avec les cultures;

4° Les souris réceptives acquièrent l'immunité active. Celle-ci est d'ordre exclusivement phagocytaire. Ce fait est d'autant plus saillant que l'immunité active a été elle-même plus poussée;

5° L'immunité passive des souris à l'égard de *T. Lewisi* Kent est d'ordre exclusivement phagocytaire. On s'en rend bien compte quand on inocule une forte dose de sérum immunisant par rapport à celle du sang trypanosomé;

6° Les flagellés sont détruits en pleine vitalité, ce que l'on constate avec la plus grande netteté quand la dernière partie englobée est le flagelle : celui-ci reste alors mobile jusqu'à complète disparition.

EXPLICATION DE LA PLANCHE III

DESSINÉES SUR LE PLAN DE LA TABLE, AVEC UNE CHAMBRE CLAIRE ZEISS, L'OCULAIRE COMPENSATEUR ZEISS N° 4 ET L'OBJECTIF A IMMERSION STIASSNIE 1/15e.

Figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6. — Différents stades de la phagocytose des flagellés d'une culture de Bouton d'Orient par les mononucléaires de la souris.

Fig. 1. — Le leptomonas est piqué par l'extrême bout du flagelle sur un lymphocyte.

Fig. 2. — Plusieurs leptomonas, dont les flagelles sont déjà englobés, sont piqués sur un lymphocyte.

Fig. 3. — Dans un mononucléaire, on ne voit que le noyau et le blépharoplaste d'un leptomonas dont on ne distingue plus le contour; dans l'autre mononucléaire, un leptomonas renflé en boule et un leptomonas en voie d'englobement.

Fig. 4 et 5. — Mononucléaires avec des vacuoles dont le contenu prend une teinte acidophile quasi homogène. Il s'agit vraisemblablement d'un stade avancé de la phagocytose des leptomonas.

Fig. 6. — Dans le cytoplasme d'un mononucléaire, sous forme de granulations plus ou moins grossières, des enclaves chromatiques qui ne sont peut-être que le stade ultime de la digestion des leptomonas.

Fig. 7. — *Tryp. phoxini* Brumpt dans le sang du vairon.

Fig. 8 et 9. — Deux trypanosomes de culture de *T. phoxini*. Chez l'un des 2 trypanosomes, le flagelle est en division avant que le blépharoplaste ne se soit divisé. Ce fait est fréquent. Entre lame et lamelle, on se rend compte que les flagelles de nouvelle formation s'agitent violemment, à la manière de véritables microgamètes, ce qui pourrait faire croire à un processus de fécondation.

Fig. 10 et 11. — Formes de culture d'un trypanosome voisin de *T. Theileri* que nous avons isolé des bœufs de France. On remarquera la forme *Leishmania,* que Swellengrebel n'a pu retrouver dans les cultures du trypanosome des bœufs de Hollande.

Fig. 12, 13 et 14. — Phagocytose des flagellés de culture de *T. noctuæ* par les leucocytes de la souris. Préparation faite vingt minutes après avoir mélangé sur lame une goutte de liquide péritonéal de souris et une goutte de culture. La figure 14 représente un polynucléaire qui a phagocyté un élément cultural.

Fig. 15. — Appareils flagellaire et blépharoplastique de *T. Lewisi* détruits en conservant entre lame et lamelle le liquide péritonéal de souris infectées.

Fig. 16. — Amas de leucocytes, dont on voit mal le contour cytoplasmique, et de *T. Lewisi*, à différents stades de phagocytose chez une souris qui a reçu 2 centimètres cubes de sérum immunisant et 1/4 centimètre cube de sang de souris infectée. En dehors des leucocytes, des granulations de Mastzellen.

Fig. 17. — Petits trypanosomes dans les cultures de *T. Lewisi*. On remarquera les petits trypanosomes renflés en boule et qu'on pourrait facilement prendre pour des kystes, n'était la coloration du flagelle.

LES AGGLUTININES
ET LES SUBSTANCES SENSIBILISATRICES
DES SÉRUMS DYSENTÉRIQUES

par T. GRYGLEWICZ

(Laboratoire du Dr W. Palmirski, à Varsovie.)

La bactériologie de la dysenterie clinique, dans l'état actuel de son développement, considère que cette maladie est causée non seulement par le bacille dysentérique de Shiga-Kruse, mais aussi par les bacilles dénommés pseudodysentériques. Kruse (1) est le premier qui fit la distinction entre le bacille pseudodysentérique et le bacille dysentérique. D'autres auteurs désignent les bacilles pseudodysentériques sous le nom de paradysentériques ou de bacilles de Flexner. Shiga (2), dans son travail récent, les considère comme une variété du bacille dysentérique. La différenciation des bacilles de la dysenterie a été facilitée par Lentz et Martini (3) qui ont employé dans ce but un milieu colorant et un sérum agglutinant de haut pouvoir. Depuis on a observé de nombreux cas sporadiques ainsi que des épidémies entières, provoquées par des bacilles paradysentériques. On les a même retrouvés plus fréquemment que le bacille dysentérique.

Dans ce travail, mes expériences ont porté sur cinq cultures du bacille dysentérique : Shiga de Král, Moscou, Cracovie, Kieff, Varsovie et sur six cultures paradysentériques : Flexner

(1) Kruse, Ueber die Ruhr als Volkskrankheit und ihren Erreger. *Deutsche medicinische Vochenschrift*, 1900, n° 40, p. 637. — Kruse, Der jetzige Stand der Dysenteriefrage. *Deutsche Ærztezeitung*, 1902, n° 2.

(2) Shiga, Typen der Dysenteriebacillen, ihr epidemiologisches Verhalten und serotherapeutische Studien. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, Bd LX, H. 1, 1908, p. 75.

(3) Martini und Lentz, Die Differenzierung der Ruhrbacillen mittels der Agglutination. *Ibidem*, Bd XLI, 1902, p. 540. — Lentz, Vergleichende kulturelle Untersuchungen über die Ruhrbacillen nebst Bemerkungen über den Lakmusfarbstoff. *Ibidem*, Bd XLI, 1902, p. 559.

de Král, Cracovie, Kieff, Saarbrücken, Müller V, Varsovie I et Varsovie II.

Le tableau ci-dessous donne les résultats de mes expériences sur la faculté des cultures ci-dessus de produire les acides aux dépens de différents hydrates de carbone et de la mannite.

		DEXTROSE	MANNITE	MALTOSE	SACCHAROSE	DEXTRINE	LACTOSE
Cultures du bacille dysentérique.	Shiga de Král	+	—	—	—	—	—
	Moscou	+	—	—	—	—	—
	Cracovie	+	—	—	—	—	—
	Kieff	+	—	—	—	—	—
	Varsovie	+	—	—	—	—	—
Cultures des bacilles paradysentériques.	Flexner de Král	+	+	+	+	—	—
	Fl. Cracovie	+	+	+	—	—	—
	Fl. Saarbrücken	+	+	+	—	—	—
	Fl. Kieff	+	+	—	—	—	—
	Fl. Varsovie	+	+	—	—	—	—

J'ajouterai que dans ces expériences je me servais des plaques de Pétri à l'agar, colorées à l'aide d'asolithmine (1). + désigne que durant 24 à 48 heures

(1) En ce qui concerne la préparation et la technique de l'ensemencement, je les ai indiquées dans mon travail précédent : « W sprawie etyologii dyzenteri i i jej leczenie surow ica. » (L'étiologie de la dysenterie et son traitement par le sérum). *Gazeta lekarska*, 1908, n° 9 = 13, p. 284.

A 100 cent. cubes d'agar ordinaire de laboratoire à 2 p. 100, contenant 2 p. 100 de peptone de Witte, j'ajoute 1,5 gr. d'hydrate de carbone ou de mannite, précédemment dissoute dans une petite quantité d'eau et 0,04 gr. d'asolitmine dissoute dans 1 cent. cube d'eau; je maintiens l'alcalinité de la solution par l'addition d'une ou de deux gouttes de potasse caustique au fur et à mesure du besoin; j'ajoute en plus 1 cent. cube de solution de cristalviolette (1 p. 1000). L'asolithmine est une substance colorante *cristalline bleue-violette*, soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool et l'éther; sa formule chimique est $C^7H^7NO^4$; comme indicateur de la formation dans le milieu des acides ou des alcalis, elle se comporte comme le lacmus liquide. Une émulsion des bactéries, fortement diluée dans une solution physiologique de NaCl, est ensemencée sur les plaques de Pétri à la surface de ce milieu solide à l'aide d'une baguette en verre, courbée à l'angle obtus.

on a obtenu des colonies nettement rouges; — veut dire que dans cet intervalle de temps les colonies n'ont pas changé la couleur bleue-violette du milieu; Fl = Flexner.

Hiss (1) distingue quatre groupes divers de bacilles paradysentériques, et Shiga (2) y ajoute un groupe nouveau. Les résultats de l'agglutination, obtenus par Hiss et Shiga concordaient en règle générale avec cette division. Par contre, Kruse (3) est d'avis que la faculté de décomposition des hydrates de carbone que présentent différentes cultures paradysentériques n'est pas toujours constante, et qu'il est difficile par conséquent de s'en servir comme base de classification des bacilles.

Mes expériences ne font que confirmer l'avis de Kruse. Dans le tableau ci-dessus je n'ai pris en considération qu'une coloration rouge nettement prononcée obtenue en 24 à 48 heures. Les cultures paradysentériques Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken se comportaient à cet égard d'une manière identique; évidemment ces cultures présentaient une étroite parenté sous d'autres rapports encore, cependant leurs agglutinines n'étaient pas identiques, comme on le verra par la suite.

Toutes nos cultures dysentériques ne différaient point de la culture originale de Shiga. Quant aux cultures paradysentériques, elles se distinguaient non seulement par la faculté de décomposition des hydrates de carbone et de la mannite, mais encore par leur propriété de former de l'indol, à l'exception de la culture paradysentérique Varsovie I. J'appelle l'attention sur le fait que la culture paradysentérique de Doerr (4), provenant d'une épidémie à Vienne, ne produisait également pas d'indol; cependant l'auteur, se basant sur ses recherches, l'identifie avec le bacille de Flexner de Manille. Leiner (5) mentionne les cultures paradysentériques caillant le lait en quelques jours. Toutes mes cultures paradysentériques ne caillent point le

(1) Hiss, On fermentative and agglutinative characters of bacilli of the dysentery group. *Journ. of med. Research.*, vol. XIII, 1904.

(2) Shiga, *Loc. cit.*

(3) Kruse, Ritterhaus Kemp und Metz, Dysenterie und Pseudodysenterie. *Zeitschrift für Hygiene und Infecktionskrankheiten*, 1907, Bd LVII, p. 417.

(4) Doerr, Beobachtungen über bacilläre Dysenterie. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, Bd XXXVIII, 1905, p. 420.

(5) Leiner (Carl), Ueber einige atypische Dysenteriestäume. *Ibidem*, Bd XLIII, 1-8, p. 783.

lait, même en deux semaines à la température de 37 degrés centigrades.

Toutes les cultures dysentériques se distinguaient en outre des cultures paradysentériques par la faculté de produire une vraie toxine soluble, de même que par leur manière de se comporter dans l'organisme du lapin et par les altérations qu'elles produisaient dans le cæcum. J'ai exposé dans mon travail précédent (1) les résultats de mes expériences sur la toxine dysentérique et sur les altérations anatomo-pathologiques qu'elle peut produire.

Pour obtenir des sérums spécifiques, j'immunisai les lapins. L'on sait que les bacilles dysentériques sont éminemment toxiques pour les lapins, c'est pourquoi il était difficile d'obtenir chez eux une immunité bien prononcée ; quant à la substance sensibilisatrice, dont il sera question plus loin, elle ne pouvait être retrouvée à l'aide de l'épreuve hémolytique d'après la méthode de Wassermann, que dans le sérum des lapins ayant préalablement supporté l'injection intraveineuse de doses considérables des corps bactériens (1/2 à 1 culture

(1) *Loc. cit.*, p. 183, 203, 233 et 236. J'ai réussi à obtenir une toxine puissante, non seulement des cultures faites dans le bouillon de Martin, mais aussi des cultures faites dans le bouillon ordinaire de veau, contenant 2 p. 100 de peptone de Witte. La plus forte toxine est celle qu'on obtient des cultures faites dans un bouillon neutre ou faiblement alcalin. La dose de toxine mortelle pour un lapin pesant 1.500 gr. atteignait, dans les cultures sur bouillon de trois semaines, jusqu'à 0,04 cent. cubes (en injection intraveineuse). 0,1 cent. cube de filtrat d'une culture de 5 jours, produisait le même effet. Les extraits de corps bactériens, faits par la solution physiologique de NaCl et filtrés sur une bougie Chamberland, possédaient tous les caractères de la toxine obtenue dans le filtrat des cultures sur bouillon. Le sérum des animaux immunisés à l'aide des bactéries avait des propriétés antitoxiques. La toxine et l'antitoxine se neutralisaient proportionnellement (Gesetz der Multipla). La toxine dysentérique ressemblait à une vraie toxine soluble. Aussi bien la toxine que les bacilles vivants provoquent chez les lapins, dans le cæcum, des altérations plus ou moins profondes.

Ces altérations, on pourrait les exprimer par la gradation suivante :

1. Hyperémie et tuméfaction de la muqueuse;
2. Hémorragies dans la muqueuse;
3. Formation des exsudats des membranes de fibrine et ulcérations superficielles;
4. Abcès profonds accompagnés d'infiltration de la sous-muqueuse, d'infiltration et d'hypertrophie de la couche musculaire.

J'ai constaté ces altérations chez 45 p. 100 des lapins (28 sur 63) et seulement dans le cæcum.

Quant aux bacilles paradysentériques, ils ne produisaient pas ces altérations et ne formaient pas de toxine soluble.

sur agar). Je commençais l'immunisation par de faibles doses de cultures sur agar, tuées par le chauffage durant une demi-heure à la température de 60 degrés centigrades, et ensuite je passais graduellement aux cultures vivantes. Je débutais par des injections sous-cutanées de l'émulsion bactérienne, passais ensuite aux injections intrapéritonéales et, enfin, aux injections intraveineuses. Malgré toutes les précautions prises, une partie de mes lapins succomba; néanmoins, je suis arrivé à en immuniser la majorité à tel point que, dans l'espace de 3 à 4 mois, ils supportaient parfaitement l'injection intraveineuse d'une, même de deux cultures sur agar. Les bacilles paradysentériques sont, on le sait, peu virulents pour les lapins, l'immunité y pouvait donc être facilement acquise.

De mes expériences ainsi conduites, je ne citerai que celles qui concernent l'agglutination et les antigènes recherchés à l'aide d'hémolyse d'après la méthode de Wassermann.

Je procédais à l'agglutination de la manière suivante :

A 1 cent. cube de sérum, dilué en proportion de 1 p. 25, 1 p. 50, etc., j'ajoutais 1 cent. cube d'émulsion de culture sur agar obtenu en 24 heures dans 2,0 cent. cube d'une solution de NaCl à 0,8 p. 100; je laissais la culture pendant 8 heures à la température de 37 degrés, après quoi je notais les résultats. Pour l'absorption des agglutinines, je me servais des plaques de Petri (9 cent. de diamètre), ensemencées sur toute la surface. Je lavais les cultures de 24 heures sur chaque plaque à l'aide de 2 cent. cubes d'une solution de NaCl à 8 p. 100. Je mêlais 3,5 cent. cubes d'émulsion obtenue de deux plaques à 0,5 cent. cube de sérum non dilué et je tenais le mélange pendant 2 heures à la température de 37 degrés centigrades, et pendant 24 heures à la température de la chambre. Puis je procédais à la centrifugation du liquide trouble; le liquide transparent obtenu servait aux épreuves d'agglutination en tenant compte de la dilution créée par l'absorption $\left(\frac{0.5}{4} = \frac{1}{8}\right)$.

L'exemple suivant prouve, que pour l'absorption de l'agglutinine du bacille dysentérique, des doses beaucoup plus petites de bactéries étaient suffisantes. Un cent. cube de sérum d'un lapin immunisé à l'aide du bacille dysentérique Moscou, fut mélangé avec différentes quantités de corps bactériens du bacille dysentérique Cracovie :

a) 1 cent. cube de sérum + 2 cent. cubes d'émulsion bactérienne.
b) 1 cent. cube de sérum + 1 cent. cube d'émulsion bactérienne.
c) 1 cent. cube de sérum + 0,5 cent. cube d'émulsion bactérienne.

Après 24 heures, on centrifuge les liquides *a*, *b*, *c*, et l'on procède aux épreuves d'agglutination.

CULTURES de bacilles dysentériques.	SÉRUM			
	Avant l'absorption.	Après l'absorption.		
		a	*b*	*c*
Shiga de Král	1.500	0	0	50
Cracovie	1.500	0	0	100
Moscou.	500	0	0	0
Kieff	500	0	0	0
Varsovie	800	0	0	100

Les chiffres indiquent la plus forte dilution du sérum à laquelle l'agglutination était encore possible; O, qu'à la dilution de 1/50 l'agglutination ne se faisait plus; — que l'épreuve n'était pas faite. Les mêmes signes ont été conservés dans d'autres tableaux concernant l'agglutination.

Cet exemple prouve qu'un cent. cube d'émulsion, contenant approximativement une quantité de bactéries correspondant à la moitié d'une plaque en agar, suffisait complètement pour l'absorption de l'agglutinine d'un cent. cube de sérum.

Par contre, les agglutinines des bacilles paradysentériques, surtout les agglutinines collatérales, étaient absorbées par les bactéries beaucoup plus difficilement, de sorte que souvent 3,5 cent. cubes d'émulsion de deux plaques étaient insuffisantes pour l'absorption de l'agglutinine de 0,5 cent. cube de sérum (1). Dans ces cas, je répétais l'absorption des liquides soumis à la centrifugation après la première absorption.

Toutes ces expériences d'agglutination étaient exécutées macroscopiquement. Si après l'absorption la quantité de liquide nécessaire à l'agglutination était très petite, j'exécutais les essais dans les tubes minces, en utilisant non pas 1 cent. cube entier de la dilution du liquide, mais 0,3 ou 0,4 cent. cube, en y ajoutant

1) Pour les relations entre l'agglutinogène et l'agglutinine, voir le travail d'Eisenberg et de Volk : « Untersuchungen uber die Agglutination ». *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, Bd XL, 1902, p. 155.

la même quantité d'émulsion d'une culture sur agar dans 12 cent. cubes d'une solution de NaCl à 0,8 p. 100.

AGGLUTININES DES SÉRUMS DES LAPINS IMMUNISÉS PAR LES CULTURES DU BACILLE DYSENTÉRIQUE.

TABLEAU I. — **Sérum du lapin, immunisé par le bacille dysentérique Cracovie.**

		Sérum.												
		AVANT L'IMMUNISATION	APRÈS L'IMMUNISATION	APRÈS L'ABSORPTION PAR LES CULTURES										
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Varsovie.	Flexner de Král.	Fl. Carcovie.	Fl. Kieff.	Fl. Saarbrücken.	Fl. Varsovie I.	Fl. Varsovie II.
Cultures du bac. dysentérique.	Shiga de Král	0	1500	0	0	0	0	0	1500	1500	1500	1500	1500	1500
	Moscou	0	500	0	0	0	0	0	500	500	500	500	500	500
	Cracovie	0	1500	0	0	0	0	0	1500	1500	1500	1500	1500	1500
	Kieff	0	500	0	0	0	0	0	500	500	500	500	500	500
	Varsovie	0	900	0	0	0	0	0	900	900	900	900	900	900
Cultures des bac. paradysentériques.	Flexner de Král	0	50	0	0	0	0	0	0	50	50	0	0	50
	Fl. Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Saarbrücken	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie I	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie II	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Les résultats furent identiques avec le sérum du lapin immunisé par le bacille dysentérique Moscou, et avec le sérum du lapin immunisé par le bacille Kieff, c'est pourquoi je ne donne point de tableau correspondant à ces expériences.

Il résulte de ces expériences que le sérum de lapin convient particulièrement pour la distinction des bacilles dysentériques et paradysentériques. Les premiers ne font presque pas naître, dans l'organisme du lapin, d'agglutinines collatérales pour les b. paradysentériques. En même temps, ces expériences prou-

vent que toutes les cultures dysentériques, de provenances diverses, sont parfaitement identiques au point de vue de l'agglutination. Parmi les bacilles expérimentés, quelques-uns seulement avaient une faculté d'agglutination moindre (Moscou, Kieff). Le sérum des lapins, immunisés par une culture quelconque du bacille dysentérique, acquiert la propriété d'agglutiner toutes les cultures du même bacille.

Tableau II. — **Sérum du lapin, immunisé par le bacille dysentérique Varsovie.**

		Sérum.												
		Avant l'immunisation	Après l'immunisation	Après l'absorption par les cultures										
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Varsovie.	Flexner de Král.	Fl. Cracovie.	Fl. Kieff.	Fl. Saarbrücken.	Fl. Varsovie I.	Fl. Varsovie II.
Culture du bac. dysentérique.	Shiga de Král	0	1800	0	0	0	0	0	1800	1800	1800	1800	1800	1800
	Moscou	0	600	0	0	0	0	0	600	600	600	600	600	600
	Cracovie	0	1500	0	0	0	0	0	1500	1500	1500	1500	1500	1500
	Kieff	0	500	0	0	0	0	0	500	500	500	500	500	500
	Varsovie	0	1200	0	0	0	0	0	1200	1200	1200	1200	1200	1200
Culture des bac. paradysentériques.	Flexner de Král	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Saarbrücken	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie I	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie II	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Les sérums des lapins immunisés ne montrent presque aucune parenté entre les cultures dysentériques et paradysentériques. Par contre, le sérum des chevaux immunisés par le bacille dysentérique, contient en général des quantités notables d'agglutinines collatérales pour les bacilles paradysentériques.

Dans les expériences d'Eisenberg (1), le sérum d'un cheval immunisé exclusivement par le bacille dysentérique Shiga, avait la propriété d'agglutiner le bacille dysentérique en dilution de 1/1.200 à 1/2.400, et le bacille paradysentérique de Flexner en dilution de 1/600. Dans les expériences d'absorption, l'agglutinine du bacille Flexner montrait les propriétés de l'agglutinine collatérale : les cultures des bacilles dysentériques absorbaient du sérum leur propre agglutinine aussi bien que l'agglutinine du bacille de Flexner; quant aux cultures du bacille Flexner, elles n'absorbaient que leur agglutinine sans changer le pouvoir agglutinatif par rapport aux bacilles dysentériques.

Dans mes expériences personnelles, le sérum d'un cheval, immunisé par les cultures dysentériques de trois semaines sur bouillon, agglutinait les diverses cultures de ce bacille en dilution de 1/750 à 1/1.200, et les bacilles paradysentériques en dilution de 1/50 à 1/100. Les cultures dysentériques absorbaient de ce sérum, à côté de l'agglutinine principale, les agglutinines collatérales des cultures paradysentériques. Je dois remarquer que le sérum de ce cheval n'était pas examiné avant l'immunisation; or, dans les expériences faites sur le sérum des quinze chevaux non immunisés, le sérum de quatre d'entre eux agglutinait les diverses cultures de bacilles paradysentériques en dilution de 1/60 à 1/120. Ces sérums n'agglutinaient jamais les bacilles dysentériques en dilution supérieure à 1/10-1/20.

Eisenberg (*loc. cit.*) mentionne le sérum d'un cheval non immunisé, qui agglutinait le bacille paradysentérique avec lequel il expérimentait, en dilution de 1/375.

Les tableaux (III, IV, V, VI) nous montrent que le sérum des lapins immunisés par les bacilles paradysentériques ne contenait point d'agglutinine pour des cultures dysentériques, et que celles-ci étaient incapables d'absorber de ce sérum les agglutinines des cultures paradysentériques. Quant à la littérature sur la question, je n'ai trouvé un résultat un peu dif-

(1) Eisenberg (Filip), O pokrewiénstwie obu typow bakteryi czerwonkowych na podstawie odczynow biologicznych. (De la parenté de deux types de bacilles dysentériques, basée sur leurs propriétés biologiques.) *Przeglad lekarski*, 1904, n° 20.

férent que dans une expérience de Kruse (1). Le sérum d'un lapin immunisé par le bacille paradysentérique « Constantinople A » agglutinait ce bacille en dilution de 1/100.000, et le bacille dysentérique en dilution de 1/100 (expérience microscopique).

AGGLUTININES DES SÉRUMS DES LAPINS IMMUNISÉS PAR LES CULTURES PARADYSENTÉRIQUES.

TABLEAU III. — **Sérum du lapin, immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Kral.**

		AVANT L'IMMUNISATION	APRÈS L'IMMUNISATION	APRÈS L'ABSORPTION PAR LES CULTURES							
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Flexner de Král.	Fl. Cracovie.	Fl. Kieff.	Fl. Saarbrücken.
		Sérum.									
Cultures du bac. dysentérique.	Shiga de Král. . . .	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Moscou.	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Culture des bac. paradysentériques.	Flexner de Král . .	0	500	500	500	500	500	0	500	500	0
	Fl. Cracovie	0	300	300	300	300	300	0	0	300	0
	Fl. Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Saarbrücken . .	0	500	500	500	500	500	0	500	500	0

Dans mes expériences, la culture paradysentérique Fl. Kieff (tableau V) se comportait d'une manière toute particulière. Le sérum des lapins immunisés par les cultures Fl. Král, Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken (tableaux III, IV, VI) n'agglutinait point cette culture. Mais le sérum du lapin immunisé par la culture Fl. Kieff (tableau V) agglutinait toutes les cultures para-

(1) KRUSE, RITTERHAUS, KEMP et METZ, *loco citato*, p. 439.

dysentériques à l'exception des cultures Fl. Varsovie I, Fl. Varsovie II.

Les cultures paradysentériques dont on se servait pour immuniser les lapins, absorbaient de leur sérum, à côté de leur agglutinine principale, des agglutinines collatérales appartenant aux autres cultures (tableaux III, IV, VI). Le résultat est différent dans le tableau V. La culture Fl. Kieff n'absorbait de son sérum que son agglutinine propre, sans absorber celle des cultures Fl. Král, Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken.

Il serait difficile d'expliquer d'une manière satisfaisante ces relations entre les agglutinines de diverses cultures paradysentériques dans ce sérum.

Tableau IV. — **Sérum du lapin, immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Cracovie.**

		AVANT L'IMMUNISATION	APRÈS L'IMMUNISATION	APRÈS L'ABSORPTION PAR LES CULTURES									
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Varsovie.	Flexner de Král.	Fl. Cracovie.	Fl. Saarbrücken.	Fl. Varsovie I.	Fl. Varsovie II.
		Sérum.											
Cultures du bac. dysentérique.	Shiga de Král	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Moscou	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Varsovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cultures des bac. paradysentériques.	Flexner de Král	0	150	150	150	150	150	150	0	0	0	0	0
	Fl. Cracovie	0	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	0	0	4000	4000
	Fl. Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Saarbrücken	0	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	0	0	1500	1500
	Fl. Varsovie I	0	300	300	300	300	300	300	0	0	0	0	0
	Fl. Varsovie II	0	800	800	800	800	800	800	800	0	0	0	0

Tableau V. — **Sérum du lapin immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Kieff.**

		Avant l'immunisation	Après l'immunisation	Après l'absorption par les cultures								
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Varsovie.	Flexner de Král.	Fl. Cracovie.	Fl. Kieff.	Fl. Saarbrücken.
		Sérum.										
Cultures du bac. dysentérique.	Shiga de Král. . .	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Moscou	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Varsovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cultures des bac. paradysentériques.	Flexner de Král. .	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0
	Fl. Cracovie	0	400	400	400	400	400	400	400	0	400	0
	Fl. Kieff.	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	300	0	1000
	Fl. Saarbrücken. .	0	300	300	300	300	300	300	300	0	300	0
	Fl. Varsovie I. . .	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie II . .	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Le rapport entre les agglutinines des sérums particuliers, correspondant aux cultures paradysentériques Fl. Král, Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken (tableaux III, IV, VI) pourrait être exprimé schématiquement comme suit :

Tableau III. — Sérum Fl. Král (voir p. 213).

Schéma 1.

Ce schéma montre que la culture Fl. Král absorbait de ce

sérum l'agglutinine Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken ; la culture Fl. Saarbrücken absorbait les agglutinines des cultures Fl. Král et Fl. Cracovie ; quant à la culture Fl. Cracovie, elle n'absorbait ni l'agglutinine de la culture Fl. Král, ni celle de la culture Fl. Saarbrücken.

Tableau VI. — **Sérum du lapin, immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Saarbrücken.**

		AVANT L'IMMUNISATION	APRÈS L'IMMUNISATION	APRÈS L'ABSORPTION PAR LES CULTURES							
				Shiga de Král.	Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Flexner de Král.	Fl. Cracovie.	Fl. Kieff.	Fl. Saarbrücken.
		Sérum.									
Cultures du bac. dysentérique	Shiga de Král . . .	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Moscou.	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cracovie	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Cultures des bac. paradysentériques.	Flexner de Král . .	0	500	500	500	500	500	0	500	500	0
	Fl. Cracovie	0	400	400	400	400	400	400	0	400	0
	Fl. Kieff	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Saarbrücken . .	0	600	600	600	600	600	600	600	600	0
	Fl. Varsovie I . . .	0	300	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fl. Varsovie II . . .	0	300	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau IV. — Sérum Fl. Cracovie (v. p. 214).

Schéma 2.

Fl. Král (−) (−)
(+) Fl. Saarbrücken (+)
(+) (+)
Fl. Cracovie

TABLEAU VI. — Sérum Fl. Saarbrücken (voir p. 216).

Schéma 3.

Fl. Král (−) → ← (+) Fl. Saarbrüken
(−) ↘ ↙ (+)

(−) ↖ ↗ (−)
Fl. Cracovie

Le rapport exprimé dans ces schémas pourrait être expliqué en supposant trois récepteurs agglutinatifs *a*, *b*, *c*, groupés comme suit :

Flexner de Král	*a*, *b*.
Fl. Cracovie	*b*, *c*.
Fl. Saarbrücken	*a*, *b*, *c*.

Le sérum du lapin immunisé par la culture Fl. Král (tableau III, schéma 1), contient les agglutinines correspondant aux récepteurs *a* et *b* ; il agglutine donc également les cultures Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken, qui contiennent un de ces récepteurs ou tous les deux. La culture Fl. Cracovie n'absorbe point des agglutinines de ce sérum, correspondant aux cultures Fl. Král et Fl. Saarbrücken, car elle n'a que le récepteur *b* et qu'elle est dépourvue du récepteur *a*. La culture Fl. Saarbrücken, ayant les deux récepteurs *a* et *b*, absorbe les agglutinines de deux cultures Fl. Král et Fl. Cracovie. Le schéma 2 s'explique de la même manière (tableau IV) ; il en est de même du schéma 3 (tableau VI).

Il suffit d'admettre l'existence de trois récepteurs agglutinogènes *a*, *b* et *c* pour expliquer les résultats acquis. Il n'est pas impossible que nous puissions trouver encore dans lesdites cultures, d'autres récepteurs agglutinogènes en examinant, à l'aide des sérums agglutinants, leurs relations avec les autres cultures paradysentériques. On peut en tirer la conséquence, qu'on ne doit point identifier deux cultures paradysentériques, en se basant uniquement sur leur manière de se comporter par rapport à un seul sérum agglutinant. Ce n'est que leur manière de se comporter par rapport aux agglutinines de plusieurs animaux, dont chacun fut immunisé par une autre culture para-

dysentérique, qui permet de se prononcer sur l'identité ou la différence des deux cultures comparées.

A en juger d'après le schéma 1, les cultures Fl. Král et Fl. Saarbrücken pourraient être supposées identiques; cependant, le schéma 2 et le schéma 3 montrent qu'elles diffèrent par leurs récepteurs agglutinogènes. Il en est de même des cultures Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken. Le schéma 2 les ferait identifier, tandis que les schémas 1 et 3 indiquent leur différence.

Chacune des six cultures paradysentériques que j'ai étudiées avait un groupe particulier de récepteurs agglutinogènes. Quelques-uns d'entre eux étaient communs à la plupart des cultures paradysentériques. L'immunisation à l'aide d'une seule culture faisait naître, dans l'organisme animal, des agglutinines collatérales pour d'autres cultures, ayant un ou deux récepteurs agglutinogènes communs. Toutes ces cultures paradysentériques n'étaient pas identiques malgré l'étroite parenté qui les unissait.

En ce qui concerne les cultures dysentériques, nous pouvons affirmer catégoriquement que toutes ces cultures sont identiques, indépendamment de leur provenance.

Les sérums paradysentériques des lapins immunisés n'agglutinaient jamais les cultures dysentériques. Les sérums dysentériques ne contenaient que rarement des quantités insignifiantes d'agglutinines collatérales dans certaines cultures paradysentériques (voir tableau I).

Ceci dit, je passe à la question des substances sensibilisatrices des sérums dysentériques et paradysentériques, autrement dit, à la question de la *fixation du complément par les extraits bactériens à l'aide des sérums spécifiques*. Bordet (1) identifie la substance sensibilisatrice découverte par la méthode hémolytique, avec les bactériolisines de Pfeiffer et les ambocepteurs d'Ehrlich. Wassermann et Bruck (2) ont modifié la technique de la fixation du complément par les bactéries à l'aide des

(1) Bordet, Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérums cytolytiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, p. 257.

(2) Wassermann und Bruck, Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präcipitirung zusammenhängende Erscheinung oder Amboceptorenwirkung? *Medicinische Klinik*, 1905, n° 55.

sérums spécifiques et ont appliqué, au lieu de l'émulsion bactérienne, des extraits aqueux des corps bactériens. Tout récemment, quelques auteurs ont supposé que dans des expériences exécutées d'après la méthode de Bordet-Gengou ou d'après celle de Wassermann, *la déviation du complément* ne dépend pas toujours de sa *fixation* par les corps bactériens ou leurs extraits à l'aide de l'ambocepteur [Moreschi (1), Neufeld et Hüne (2), Wassermann et Luchs (3), Krumbein et Schatiloff (4), Ballner et Reibmayr (5)]. La formation du précipité n'est pas sans influence sur le complément [Pfeiffer et Moreschi (6), Moreschi (7)]. Les travaux de B. Zebrowski sur cette question sont également d'une haute importance (8-9). Il a démontré que la précipitine ne précipite pas l'ambocepteur hémolytique dans le sérum.

Le phénomène de la déviation du complément, dans les expériences hémolytiques de Wassermann, concernant les sérums spécifiques et les extraits bactériens, n'est pas jusqu'ici théoriquement étudié. Les expériences de Wassermann ont démontré la spécificité complète des sérums correspondants, au moins en ce qui concerne le typhus et le paratyphus. J'ai appliqué les mêmes expériences aux bacilles dysentériques.

En ce qui concerne la dysenterie, je ne connais que le travail

(1) Moreschi, Ueber den Wert des Kromplementablenkungsverfahrens in der bakteriologischen Diagnostik. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1907, n° 38.

(2) Neufeld und Hune, Untersachungen über baktericide Immunität und Phagocytose nebst. Beiträgen zur Frage der Komplementablenkung. *Arbeiten aus der Kaiserl. Gesundheitsamte*, Bd XXV, p. 192.

(3) Wassermann und Leuchs, Erwiderung auf die Arbeit von Moreschi. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1907, n° 49, p. 1506.

(4) Krumbein und Schatiloff, Untersuchungen über das Meningococcenserum. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 23, p. 1002.

(5) Ballner und Reibmayr, Ueber die Verwertbarkeit der Komplementablenkungsmethode für die Differenzierung von Mikroorganismen, nebst Bemerkungen über den Zusammenhang dieses Phänomens mit der Agglutinations-bezw. Präcipitationsreaktion. *Archiv für Hygiene*, 1908, Bd LXIV, p. 113.

(6) Pfeiffer und Moreschi, Ueber scheinbare antikomplementäre und Antiamboceptorenwirkungen präcipitirender sera im Thierkörper. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1906, n° 2.

(7) Moreschi, Zur Lehre der Antikomplementen. *Ibidem*, 1906, p. 100.

(8) Zebrowski (B.), Precipitation et deviation de l'alexine. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1907, Bd XLIV, p. 556.

(9) Zebrowski (B.), Ostosunku substancyi uczulajacej hemolityeznej do precipitynogenu. *Gazeta lekarska*, 1907, n° 38, p. 900.

de Dopter (1), qui touche à cette question. L'auteur a employé la méthode de Bordet-Gengou, en examinant le sérum des animaux immunisés (cheval, lapin) et des hommes atteints de dysenterie provoquée par le bacille dysentérique ou par les variétés des bacilles paradysentériques. Les sérums dysentériques et paradysentériques déviaient d'une manière identique le complément, étant unis soit à l'émulsion des bacilles dysentériques, soit à celui des cultures paradysentériques. Le phénomène se produisait même avec l'émulsion de certaines cultures de coli-bacille. Se basant sur les résultats acquis, Dopter identifie presque toutes les cultures dysentériques et paradysentériques; il ne les considère que comme « races » particulières d'un seul et même bacille, faisant naître la dysenterie chez l'homme.

Quant à nos expériences, exécutées d'après la méthode de Wassermann, elles n'ont point démontré d'aussi étroite parenté des diverses cultures dysentériques et paradysentériques.

J'ai préparé mes extraits aqueux d'après la méthode de Wassermann. A l'aide de 5 cent. cubes d'eau distillée stérile, j'ai lavé les cultures de 24 heures sur 140 cent. cubes d'agar. Les sérums correspondants précipitaient ces extraits, mais la précipitation ne se produisait qu'en dilution faible; or, les mélanges des sérums et des extraits en dilutions, dont on se sert dans les expériences de fixation du complément, restaient parfaitement limpides, même dans un temps prolongé.

Les sérums des lapins, dont chacun fut vacciné par une seule culture dysentérique ou paradysentérique étaient préalablement chauffés pendant une demi-heure à 56 degrés centigrades. Je me servais comme complément du sérum frais des cobayes, au plus tard 24 heures après la saignée.

J'ai préparé les sérums hémolytiques en immunisant les lapins à l'aide des globules rouges du bœuf. Les globules rouges, servant aux injections des lapins et aux épreuves hémolytiques, étaient soigneusement lavés avec une solution de NaCl à 0,9 p. 100. J'ai chauffé également les sérums hémolytiques à 56 degrés centigrades pendant une demi-heure.

(1) Dopter, Sensibilisatrice spécifique dans le sérum des animaux vaccinés et de malades. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, p. 753.

Toutes ces dilutions se faisaient dans une solution de NaCl à 0,9 p. 100. Je me servais toujours d'*un centimètre cube* des dilutions des extraits bactériens, des sérums spécifiques du sérum hémolytique et de l'émulsion des globules rouges à 5 p. 100 en solution dans le NaCl à 0,9 p. 100. J'ai ajouté à toutes ces épreuves le complément non dilué, soit 0,1 cent. cube. Le volume du mélange était donc le même dans tous ces essais et égal à 4,1 cent. cubes. Dans chaque expérience, je me servais des globules rouges frais. Chacune d'elles était exécutée durant un jour. Chaque fois, les doses de contrôle étaient préalablement déterminées ainsi qu'il suit :

1° La plus petite dose du sérum hémolytique dissolvant complètement les globules rouges à l'aide de 0,1 cent. cube du complément (D. M. S. = *dosis minimalis solvens*).

2° La dose maximale du sérum spécifique du lapin, qui ne dévie pas par elle-même le complément (D. max. non abs. S. = *dosis maximalis non absorbens seri*);

3° La dose maximale d'extrait bactérien, ne déviant pas le complément par elle-même (D. max. non abs. E. = *dosis maximalis non absorbens extracti*).

Sur les vingt expériences ainsi exécutées, je n'en citerai que deux comme exemple : l'une concernant le sérum du lapin immunisé par le bacille dysentérique Cracovie, l'autre concernant le sérum du lapin immunisé par le bacille dysentérique Kieff.

Exp. III. — Le lapin fut immunisé par le bacille dysentérique Cracovie et il a reçu, depuis le 27 août jusqu'au 28 décembre 1907, des injections sous-cutanées, intrapéritonéales et intraveineuses, contenant au total l'émulsion de 10 cultures sur agar. Pour la première fois, l'injection sous-cutanée de 2 milligrammes d'une culture sur agar, tuée à la température de 60 degrés centigrades, provoqua chez un lapin, pesant 4.000 grammes, une maladie sérieuse d'une durée de deux semaines. Un autre lapin, ayant reçu la même dose de culture Moscou, succomba après quatre jours. En continuant la vaccination très prudemment, je suis arrivé à faire supporter au lapin des injections intraveineuses d'une et même de deux cultures sur agar.

1° Définition de la force du sérum hémolytique (D. M. S.).

QUANTITÉ de sérum hémolytique, dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ de solution de NaCl à 0,9 p. 100 ajoutée.	QUANTITÉ de complément	QUANTITÉ D'ÉMULSION des globules rouges de bœuf à 5 p. 100.	RÉSULTATS
0,01	2,0	0.1	1.0	Hémolyse complète.
0,005	»	»	»	»
0.0025	»	»	»	»
0,001	»	»	»	»
0,0005	»	»	»	Hémol. presque complète
0,00025	»	»	»	Hémolyse incomplète.
—	»	»	»	0 (1)
0.01	»	»	»	0

(1) 0 indique que les globules rouges restent parfaitement insolubles.
D. M. S = 0,001.

Le complément et le sérum hémolytique eux-mêmes ne faisaient pas dissoudre les globules rouges.

2° Détermination de la dose maximale du sérum spécifique ne déviant pas par elle-même le complément.

QUANTITÉ de sérum spécifique dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ de solution de NaCl à 0,9 p. 100 ajoutée.	QUANTITÉ de complément.		QUANTITÉ de sérum hémolytique dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ D'ÉMULSION des glob. rouges de bœuf à 5 p. 100.	RÉSULTATS
0,2	1,0	1,0	1 h. à la tempér. de 37° C.	0,002	1,0	Hémolyse incomplète.
0,1	»	»		»	»	Hémolyse complète.
0,05	»	»		»	»	»
0.2	»	—		»	»	0

Le sérum spécifique par lui-même, ne dissout pas les globules rouges.

3° Détermination des doses maximales d'extraits des cultures dysentériques Cracovie et Kieff et paradysentérique Fl. Cracovie, qui par elles mêmes ne déviaient pas le complément.

QUANTITÉ D'EXTRAIT dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ DE SOLUTION de NaCl à 0,9 p. 100 ajoutée	QUANTITÉ DE COMPLÉMENT		QUANTITÉ DE SÉRUM HÉMOLYTIQUE dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ D'ÉMULSION des glob. rouges de bœuf à 0,5 p. 100.	RÉSULTATS EXTRAITS DE CULTURES : Cracovie.	Kieff.	Fl. Cracovie.
0,16	1,0	0,1	1 h. à la temp. de 37° cent.	0,002	1,0	H. très faible.	H. très faible.	H. très faible.
0,12	»	»		»	»	Hém. incomp.	Hém. incomp.	Hém. incomp.
0,1	»	»		»	»	Hém. incomp.	Hém. incomp.	Hém. incomp.
0,08	»	»		»	»	Hém. compl.	Hém. compl.	Hém. compl.
0,06	»	»		»	»	»	»	»
0,1	»	»		»	»	0	0	0

D. max. non abs. E :

Cracovie . . . . 0,08 — 0,1
Kieff. . . . . 0,08 — 0,1
Fl. Cracovie . . . . 0,08 — 0,1

Les extraits par eux-mêmes ne dissolvent point les globules rouges.

Cette expérience nous prouve que le sérum du lapin, immunisé par la culture dysentérique Cracovie, a fixé le complément à l'aide des extraits des cultures dysentériques Kieff et Cracovie, sans le fixer cependant avec l'extrait de la culture paradysentérique Fl. Cracovie.

Exp. XVIII. — Le lapin fut immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Kieff. Depuis le 2 janvier jusqu'au 8 mars 1908, il a reçu des injections sous-cutanées, intrapéritonéales et intraveineuses au nombre de 10 cultures sur agar. A la fin de l'immunisation, il supportait bien une culture sur agar en injection intraveineuse.

4° **Fixation du complément par les extraits bactériens à l'aide du sérum immunisé.**

QUANTITÉ D'EXTRAIT dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ DE SÉRUM SPÉCIFIQUE dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ DE COMPLÉMENT	.	QUANTITÉ DE SÉRUM HÉMOLYTIQUE dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ D'ÉMULSION des glob. rouges du bœuf, à 5 p. 100.	RÉSULTATS — EXTRAITS DE CULTURES : Cracovie.	Kieff.	Fl. Cracovie.
0,02	0,05	0,1	1 heure à la temp. de 37° centigr.	0,002	1,0	0	0	Hém. compl.
»	0,02	»		»	»	0	0	»
»	0,01	»		»	»	0	0	»
»	0,0075	»		»	»	Trace d'hém.	Trace d'hém.	»
»	0,005	»		»	»	Hém. incomp.	Hém. incomp.	»
»	0.05	—		»	»	0	0	0
Le sérum contrôlant d'un lapin non immunisé A.								
0,02	0,075	0,1	1 h. à la temp. de 37° cent.	0,002	1,0	Hém. compl.	Hém. compl.	Hém. compl.
»	0,05	»		»	»	»	»	»
»	0,075	—		»	»	0	0	0
—	0,075	0,1		»	»	Hém. compl.	Hém. compl.	Hém. compl.

Dans cette expérience, on a mis à l'épreuve les extraits aqueux des trois cultures paradysentériques : Fl. Kieff, Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken (1).

1° D.M.S. du sérum hémolytique 0,002
2° D. max. non abs. S . . . . 0.1 — 0.2
3° D. max. non abs. E. :

Fl. Kieff . . . . 0,1 — 0,12
Fl. Cracovie. . . . . 0.1 — 0.12
Fl. Saarbrücken . . . . 0.08 — 0.1

(1) Toutes mes autres expériences furent exécutées d'après les schémas présentés dans les expériences III et XVIII. Les doses maximales d'extraits incapables de dévier le complément par elles-mêmes sont entre 0,08 à 0,1 ou bien entre 0,1 à 0,12, les doses correspondantes des sérums sont entre

5° **Fixation du complément par les extraits à l'aide du sérum immunisé.**

QUANTITÉ D'EXTRAIT dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ DE SÉRUM SPÉCIFIQUE dans 1 centimètre cube.	QUANTITÉ DE COMPLÉMENT		QUANTITÉ DE SÉRUM HÉMOLYTIQUE dans 1 centimètre cube	QUANTITÉ D'ÉMULSION des glob. rouges du bœuf, à 5 p. 100.	RÉSULTATS — EXTRAITS DE CULTURES : Fl. Kieff.	Fl. Cracovie.	Fl. Saarbrücken.
0,02	0,05	0,1	1 h. à la temp. de 37° centigr	0,004	1,0	0	Hém. compl.	Hém. compl.
»	0,02	»		»	»	0	»	»
»	0,01	»		»	»	0	»	»
»	0,0075	»		»	»	Hém. incomp.	»	»
»	0,005	»		»	»	Trace d'hém.	»	»
»	0,05	»		»	»	0	0	0
Le sérum contrôlant d'un lapin non immunisé F.								
0.2	0,075	0,1		0,004	1,0	Hém. compl.	Hém. compl.	Hém. compl.
»	0,05	»		»	»	»	»	»
»	0,075	—		»	»	0	0	0
—	0.575	»		»	»	Hém. compl.	Hém. compl.	Hém. compl.

0,1 à 0,2. Dans toutes mes expériences, je me servais de 0,02 d'extrait, c'est-à-dire d'une dose quatre ou cinq fois plus petite que la dose maximale d'extrait, ne déviant pas le complément. La première dose du sérum, égale toujours à 0,05, était de moitié plus petite que la dose maximale de ce sérum, ne déviant pas le complément (0,1 à 0,2). Je me gardais de prendre des quantités plus élevées d'extraits ou de sérum, de peur que le complément ne devie pas, parce que les albumines se condensent trop dans les mélanges. Les résultats très nets, d'expériences ainsi faites, permettaient de reconnaître l'identité ou la différence, voire même le degré de parenté des diverses cultures dysentériques et paradysentériques. Par exemple, le sérum du lapin, immunisé par le bacille paradysentérique Fl. Cracovie, fixait le complément par extrait de ce bacille et de celui du bacille Fl. Saarbrücken, sans le fixer cependant par les extraits d'autres cultures paradysentériques. Les agglutinogènes des bacilles Fl. Cracovie et Fl. Saarbrücken, sans être parfaitement identiques, présentaient une parenté plus prononcée que celle qui existe entre les bacilles Fl. Cracovie et Fl. Král ou entre Fl. Cracovie et Fl. Kieff et ainsi de suite (voir table d'agglutination).

Le tableau ci-dessous donne les résultats d'autres expériences, exécutées comme les précédentes :

		SÉRUMS DES LAPINS IMMUNISÉS					
		Moscou.	Cracovie.	Kieff.	Varsovie.	Fl. Cracovie.	Fl. Kieff.
Extraits des cultures dysentériques.	Shiga de Král . .	+	+	+	+	0	0
	Moscou	+	+	+	+	0	0
	Cracovie.	+	+	+	+	0	0
	Kieff.	+	+	+	+	0	0
	Varsovie	+	+	+	+	0	0
Extraits des cultures paradysentériques.	Flexner de Král .	0	0	0	0	0	0
	Fl. Cracovie . . .	0	0	0	0	+	0
	Fl. Kieff	0	0	0	0	0	+
	Fl. Saarbrücken .	0	0	0	0	+	0
	Fl. Varsovie I. .	0	0	0	0	0	0
	Fl. Varsovie II. .	0	0	0	0	—	0
	B. Coli	0	0	—	0	0	0

+, veut dire que l'hémolyse était fortement enrayée, comme dans les expériences III ou XVIII; 0, que l'hémolyse était parfaite dans toutes les épreuves; —, que l'épreuve n'était pas exécutée.

Le sérum de deux lapins, immunisés exclusivement par des injections sous-cutanées des cultures paradysentériques Fl. Král et Fl. Saarbrücken, ne fixait pas le complément par les extraits des cultures homologues. Ces lapins ont reçu, durant six semaines, quatre injections sous-cutanées de cultures sur agar.

Moreschi (1) constate qu'on obtient la fixation du complément aussi bien avec les extraits des bactéries qu'avec leur émulsion. En ce qui concerne les bacilles de la dysentérie,

(1) Moreschi, Ueber den Wert des Komplement ablenkungsverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1906, n° 38, p. 1243; 1907, n° 38, p. 1204.

Leuchsund Schöne, Ueber die Verwendbarkeit der Komplemente bindung zur Typhusdiagnose. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1908, Bd LX, p. 149.

l'expérience suivante démontre que, dans ce but, les extraits conviennent mieux que les émulsions.

Exp. XV et XXI. — Sérum du lapin ayant reçu depuis le 2 janvier jusqu'au 18 mars 1908 en injections sous-cutanées, intrapéritonéales et intraveineuses un total de 9 cultures de bacille paradysentérique Fl. Cracovie.

1° D.M.S. du sérum hémolytique 0,002
2° D. min. non abs. S . . . . 0,1 — 0.2
3° D. min. non abs. d'extrait . . . . 0,1 — 0.12
4° D. min. non abs. d'émulsion . . . . 0,1 — 0,25

QUANTITÉ D'EXTRAIT de la culture Fl. Cracovie dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ D'ÉMULSION de la culture Fl. Cracovie dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ de sérum spécifique. dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ de complément		QUANTITÉ de sérum hémolytique dans 1 cent. cube.	QUANTITÉ D'ÉMULSION des gl. rouges du bœuf à 5 p. 100.	RÉSULTATS	
							Extrait de la culture Fl. Cracovie.	Emulsion de la culture Fl. Cracovie.
0,02	0,05	0,05	0,1	Une heure à la tempér. de 37° cent.	0,004	1,0	0	Hém. compl.
»	»	0,02	»		»	»	0	»
»	»	0,01	»		»	»	0	»
»	«	0,0075	»		»	»	Hém. incomp.	»
»	»	0,005	»		»	»	Traces d'hém.	»

La quantité d'extrait 0,02 était 5 à 6 fois plus petite que la dose, qui ne déviait pas par elle-même le complément. La quantité d'émulsion 0,05 était deux à cinq fois plus petite que cette dose (0,1 — 0,25). Les mêmes doses du sérum spécifique fixaient fortement le complément à l'extrait sans le fixer par l'émulsion.

En généralisant les résultats de mes expériences, je ferai remarquer qu'elles démontrent l'identité de toutes les cultures du bacille dysentérique et l'existence de nombreuses variétés de cultures paradysentériques. Elles ont été exécutées d'après la méthode ci-dessus, n'ont révélé aucune parenté entre les bacilles dysentériques et paradysentériques. Les expériences d'agglutination sur les sérums des lapins immunisés prouvent aussi que cette parenté n'est que très éloignée.

Le bacille dysentérique se distingue, on le sait, par une virulence prononcée par rapport aux lapins et par la faculté de produire une toxine ayant tous les caractères d'une vraie toxine soluble. Les corps de ces bacilles et leur toxine font

naître, chez le lapin, le tableau caractéristique de la maladie et les altérations dysentériques dans le cæcum. Par contre, les bacilles paradysentériques ne produisent pas de ces altérations chez les lapins et sont, en général, peu virulents pour ces animaux. Cependant on les a retrouvés dans les matières fécales des malades atteints de dysenterie, là où les bacilles dysentériques proprement dits faisaient défaut, et le sérum de ces malades agglutinait les bacilles paradysentériques; — on doit en conclure que ces bacilles peuvent, eux aussi, provoquer la maladie. Les sérums des lapins immunisés par les corps bactériens du bacille dysentérique, contiennent l'antitoxine, qui neutralise la toxine de ce bacille. Quant au sérum des lapins immunisés par les bacilles paradysentériques, il ne contient pas cette antitoxine, ce que montre l'expérience suivante :

Lapin 1. Depuis le 26 juin jusqu'au 9 août 1907, on a fait six injections sous-cutanées de l'émulsion des cultures paradysentériques Fl. Saarbrücken sur agar. Le lapin reçut sous la peau un total de 6 cultures.

Lapin 2, fut immunisé simultanément et de la même manière que le 1, par le bacille parad. Fl. Král.

Lapin 3, immunisé en même temps que les précédents par des cultures sur agar du bacille dysentérique Kieff. Il en a reçu trois, dont une sous la peau.

Le 19 août, j'ai fait des saignées, et j'ai mélangé les sérums recueillis chez ces lapins dans la proportion de 0,5 cent. cubes a. 5 D.M.D. de toxine de bacille dysentérique Varsovie. J'ai injecté ces mélanges dans les veines des lapins.

Lapin 1 a) 5 D.M.L. de toxine + 0,5 cent. cubes de sérum du lapin 1 (Fl. Saarbrücken) succomba le lendemain. Lapin 2 a) 5 D.M.L. de toxine + 0,5 cent. cubes de sérum du lapin 2 (Fl. Král); ce lapin succomba pendant la nuit. Lapin 3 a) 5 D.M.L. de toxine + 0,5 cent. cubes de sérum du lapin 3, (Kieff), supporta sans tomber malade. Le lapin de contrôle, 1 D.M.L. de toxine, succomba après quatre jours.

Kraus et Doerr (1) ont obtenu des résultats analogues avec le sérum des chèvres immunisées. Ces auteurs ont, de plus, démontré que le sérum des chevaux immunisés par le bacille paradysentérique n'a pas de propriétés thérapeutiques ni préservatrices, dans l'infection expérimentale des souris par une culture vivante (non pas la toxine) du bacille dysentérique.

Jusqu'ici, autant que je sache, on ne trouve rien dans la

(1) Kraus und Doerr, Die experimentelle Grundlage einer antitoxischen Therapie der bacillarer Ruhr. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankeiten*, 1906, Bd LV, p. 33 et 34.

littérature qui permette de savoir si les bacilles dysentérique et paradysentérique provoquent, chez l'homme, des altérations anatomo-pathologiques parfaitement identiques, et si les bacilles paradysentériques, comme les dysentériques, ne se trouvent que dans le gros intestin ou bien s'ils pénètrent dans d'autres organes. Amako (1) fit l'autopsie et l'examen bactériologique de neuf cadavres d'hommes, morts de dysentérie, mais il n'a pas indiqué quels étaient les cas provoqués par le bacille dysentérique ni ceux provoqués par le b. paradysentérique. L'auteur n'a trouvé de bacille dysentérique ni dans le sang, ni dans la rate, ni dans le foie et la vésicule biliaire.

On range les bacilles dysentériques dans le groupe des *Typhus-Coli*. En effet, les bacilles paradysentériques ont des traits communs avec les bacilles de ce groupe. Quant à la parenté du bacille dysentérique avec le *Typhus Coli*, elle me paraît très éloignée. Je suppose que le bacille dysentérique, d'après toute vraisemblance, doit occuper dans ce groupe une place bien à part. C'est cette place à part par rapport au bacille paradysentérique qui, à mon avis, doit être prise en considération dans nos efforts tendant à obtenir un sérum curatif (2). Shiga, au contraire, dans son travail récent, tend à obtenir un sérum polyvalent curatif pour tous les cas de dysenterie. De ces cinq types de bacilles, l'auteur choisit ceux dont la parenté est la plus proche, les réunit en groupes et se sert de chaque groupe pour immuniser un cheval. Ensuite, en mélangeant les sérums de tous ces chevaux, l'auteur obtient un sérum polyvalent pour tous les cas de dysenterie. Shiga, sous ce rapport, ne fait pas de distinction entre les deux bacilles.

Il me paraît douteux qu'on puisse résoudre ainsi d'une manière catégorique la question de la sérothérapie en dysenterie, en se basant sur les résultats d'études expérimentales faites jusqu'ici. Il existe en effet des cas de maladies, ayant tous les symptômes cliniques de la dysenterie, et dans lesquels on ne trouve pas trace de bacille dysentérique ni paradysentérique. Jusqu'ici ce ne sont que les résultats d'examen bactériologique, dans chaque cas particulier, qui peuvent nous fournir des indi-

(1) Amako, Dysenterie epidemien und Bacillentypen. *Zeitschrift f. Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1908, Bd LX, H. 1, p. 93.
(2) Shiga, *loc. cit.*

cations relatives à l'emploi du sérum. Une fois que l'analyse a démontré qu'un cas donné est provoqué par exemple par le bacille dysentérique Shiga-Kruse, il n'y a plus lieu d'appliquer le sérum polyvalent, d'autant plus que l'action curative de sérum univalent (Shiga-Kruse) est très prononcée et que l'action du sérum paradysentérique polyvalent, dans la paradysenterie, n'est que peu étudiée jusqu'ici. Le sérum des chevaux immunisés par le bacille dysentérique et sa toxine révèle une action principalement antitoxique. La quantité d'antitoxine peut être rigoureusement déterminée chez les lapins. Kruse (1), il est vrai, est d'avis que l'homme n'est pas sensible à la toxine du bacille dysentérique, toxine qu'il appelle « Kaninchengift ». Si cette affirmation de Kruse était juste, nous ne pourrions attribuer à l'antitoxine du sérum dysentérique aucune action curative chez l'homme atteint de dysenterie due au bacille dysentérique. Il nous semble cependant, qu'il manque jusqu'ici de bases suffisantes pour considérer cet avis de Kruse comme irrécusable.

Je m'arrêterai, en terminant, sur le travail récent de Konrich (2), travail qui pourrait, jusqu'à un certain point, contredire ma manière de voir. L'auteur a cultivé un bacille doué des caractères du bacille paradysentérique Flexner, extrait des matières fécales d'un soldat qui avait eu la dysenterie six mois avant. Ce bacille cependant, dans les épreuves d'agglutination et dans l'infection expérimentale des lapins, se comportait comme le bacille dysentérique. Le bacille de Konrich appartient aux cultures s'agglutinant bien facilement. L'auteur n'a pas examiné son bacille au point de vue de la production de la toxine, et n'a pas fait d'expériences pour démontrer si les lapins immunisés par ce bacille, acquièrent l'immunité par rapport au bacille dysentérique et à sa toxine; il n'a de même pas déterminé l'antitoxine du sérum des lapins immunisés.

Varsovie, 17 octobre 1909.

(1) Kruse, Ritterhaus, Kemp und Metz, *loc. cit.*

(2) Konrich, Ueber eine isoliert gebliebene Epidemie bacillärer Ruhr in Mitteldeutschland und einen dabei gefundenen, zwischen den Typen Shiga-Kruse und Flexner stehenden Bacillus. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankeiten*, 1908, Bd LX, p. 281.

LA « PHASE NÉGATIVE » DE WRIGHT

DANS LA VACCINATION ANTITYPHIQUE DES JEUNES LAPINS

par le Dr Frederico De GASPERI.

(Travail du laboratoire de M. le professeur Metchnikoff.)

On sait que l'introduction de bacilles typhiques dans l'organisme des animaux de laboratoire amène une infection mortelle généralisée, mais celle-ci ne présente pas les caractères essentiels de la fièvre typhoïde de l'homme, avec ses lésions du tube digestif; on sait de plus que ces animaux sont susceptibles d'être vaccinés contre cette infection expérimentale.

Les cobayes et les lapins se prêtant facilement à la vaccination antityphique et à la vérification de l'immunité contre l'infection due au bacille d'Eberth, peuvent nous fournir d'utiles renseignements qui contribuent, en même temps que d'autres faits, à nous renseigner exactement sur la valeur des vaccins antityphiques.

De nombreux auteurs ont étudié les modifications biologiques du sérum des animaux et de l'homme, injecté avec les divers antigènes typhiques qui ont été préparés jusqu'ici.

Il résulte de ces travaux que dans l'organisme des vaccinés on décèle, quoique en proportions variables, la présence des différents anticorps défensifs : agglutinine, précipitine, lysine, sensibilisatrice, stimuline, opsonine.

Wright, le premier, s'est attaché à l'étude de ces anticorps. C'est en s'appuyant sur leur présence qu'il a généralisé, dans la suite, l'emploi de la vaccination antityphique chez l'homme.

Pour ce qui nous intéresse particulièrement, nous devons rappeler que, dans la fièvre typhoïde de l'homme, d'après Leishman, les stimulines et, selon Wright, Hektoen, Harrison, Achard et Foix, etc., les opsonines sont augmentées; elles sont spécifiques.

Richardson, Weaver et Tunniclif, Cevey, etc., semblent accorder peu d'importance à l'évaluation des opsonines en tant que témoins du degré de l'immunité vaccinale.

Sur l'invitation de M. le professeur Metchnikoff, nous avons étudié la vaccination antityphique sur les jeunes lapins, spécialement le pouvoir opsonique de leur sérum sanguin et la phase négative consécutive aux inoculations.

Nos expériences ont porté sur quatre lots de jeunes lapins, composés chacun de trois sujets, dont deux ont été soumis aux inoculations de vaccin antityphique, le troisième étant gardé comme témoin.

Dès le premier jour après la première injection de vaccin, nous avons suivi le cours des propriétés opsoniques chez les deux lapins traités et le témoin normal.

Nous nous sommes servi d'un vaccin préparé par nous-même d'après le procédé de Pfeiffer et Kolle : des cultures de vingt-quatre heures de bacille typhique H, virulent, sur gélose inclinée, furent émulsionnées dans 45 cent. cubes d'eau physiologique ; l'émulsion fut chauffée à 60 degrés centigrades, pendant une heure un quart, puis additionnée d'une très faible quantité d'acide phénique, chauffée à nouveau à 60 degrés pendant une demi-heure.

Un centimètre cube de ce vaccin correspond à 2 anses de 2 milligrammes de culture fraîche.

Les lapins ont reçu sous la peau trois doses successives, avec les quantités suivantes : 1 cent. cube la première fois, 2 cent. cubes la deuxième, 3 cent. cubes la troisième, en des temps variables suivant l'apparition et l'élévation du pouvoir et de l'indice opsonique, ainsi que l'on peut s'en rendre compte dans quelques-unes des expériences relatées plus loin.

Nous devons ajouter que nous n'attendions pas, pour inoculer soit la deuxième ou la troisième dose, que la courbe opsonique fléchît spontanément, nous injections les doses suivantes aussitôt que l'indice opsonique nous paraissait élevé d'une façon notable. Cela dans le but de voir s'il était possible de gagner du temps et d'abréger ainsi la période vaccinale, tout en aboutissant à une immunité solide. Ce fait nous paraît avoir son importance.

Une fois vaccinés, les animaux ont reçu dans le péritoine 7/10 d'une culture et une culture entière de vingt-quatre heures, sur gélose, de bacille typhique H, émulsionnée dans de l'eau physiologique.

Notre bacille typhique était très virulent ; 3/10 d'une culture tuaient les cobayes de 350 grammes environ, dans un délai de quatorze à vingt-quatre heures.

Mais de ce que les animaux de laboratoire n'ont qu'une faible réceptivité pour le bacille d'Eberth, il semble difficile de conclure, des effets produits chez eux par la vaccination antityphique, à ceux qu'on peut attendre, chez l'homme, de la même vaccination. L'animal pourra d'autant mieux résister à l'inoculation d'épreuve qu'il est plus facile à immuniser.

C'est pourquoi, à l'aide de la technique nouvelle indiquée par Vincent, nous avons soumis nos lapins vaccinés contre le bacille d'Eberth, ainsi que les témoins, à un mode d'infection tel qu'il amenât, d'une manière constante, la mort des témoins non vaccinés. Ceux-ci ont succombé à une généralisation du bacille typhique dans le sang et les organes, y compris l'intestin. Voici comment nous avons procédé :

Les lapins vaccinés et les témoins recevaient, sous la peau, 5 cent. cubes d'une solution hypertonique à 10 p. 100 de chlorure de sodium et immédiatement après, dans le péritoine, une émulsion de bacilles typhiques dans les doses indiquées ci-dessus (7/10 et 10/10 d'une culture).

Nous avons employé cette même technique pour infecter quatre cobayes; nous avons obtenu les mêmes résultats satisfaisants. Les animaux ont succombé dans un délai de quatorze à vingt-quatre heures, présentant à l'autopsie une péritonite typhique classique ; le bacille d'Eberth a été rencontré dans le sang, les organes et le contenu de l'intestin.

*
* *

Nous allons maintenant donner, d'une façon détaillée, deux de nos expériences de vaccination antityphique de jeunes lapins, pratiquées sous le contrôle de la méthode opsonique.

C'est ainsi que nous avons pratiqué l'opsono-réaction suivant la technique indiquée par Wright dans son livre : *Studies on immunisation*, en tenant compte toutefois des remarques faites sur la méthode par Coppelli, c'est-à-dire que nous avons toujours attendu, pour essayer les sérums des animaux vaccinés et des témoins, que six heures se soient écoulées après le prélèvement du sang.

Cette précaution ne nous a pas paru inutile, car, ainsi que Coppelli l'a constaté, le pouvoir opsonique du sérum normal, faible aussitôt après l'extraction, va progressivement et rapidement en augmentant proportionnellement au temps pendant lequel il reste en contact avec le caillot sanguin, et cela jusqu'à la cinquième heure; il demeure invariable jusqu'à la septième et diminue ensuite.

Les leucocytes utilisés étaient toujours empruntés à un animal neuf de la même espèce que les animaux vaccinés. Les émulsions microbiennes étaient, autant que possible, de même concentration. Les tubes de Wright restaient à l'étuve à 37 degrés centigrades, pendant quinze minutes, pour l'accom-

plissement de l'acte phagocytaire; puis ils étaient aussitôt plongés dans de l'eau froide, afin d'arrêter immédiatement ce phénomène biologique.

Pour l'évaluation du pouvoir opsonique et la détermination de l'indice opsonique, nous avons fait le compte des microbes phagocytés par 50 leucocytes.

EXEMPLE : EXPÉRIENCE III

31 *août* 1911.

Les lapins nº 61 (1.280 grammes) et 62 (1.350 grammes) reçoivent sous la peau chacun 1 cent. cube de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle; 1 cent. cube de ce vaccin correspond à 2 anses de culture fraîche.

Le lapin nº 1, pesant 1.400 grammes, est gardé comme témoin.

LAPINS				POUVOIR opsonique.	INDICE opsonique.
1er *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	78 : 50	Polynucléaires	= 1,56	0,92
Nº 62.	—	71 : 50	—	= 1,42	0,83
Nº 1.	—	86 : 50	—	= 1,72	1 »
2 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	58 : 50	Polynucléaires	= 1,16	0,74
Nº 62.	—	53 : 50	—	= 1,06	0,67
Nº 1.	—	78 : 50	—	= 1,56	1 »
3 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	96 : 50	Polynucléaires	= 1,92	0,64
Nº 62.	—	85 : 50	—	= 1,70	0,57
Nº 1.	—	148 : 50	—	= 2,96	1 »
4 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	312 : 50	Polynucléaires	= 6,60	2,47
Nº 62.	—	241 : 50	—	= 4,82	1,91
Nº 1.	—	126 : 50	—	= 2,52	1 »
5 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	526 : 50	Polynucléaires	= 11,24	4,19
Nº 62.	—	493 : 50	—	= 9,86	3,67
Nº 1.	—	134 : 50	—	= 2,68	1 »

Les lapins nºs 61 et 62 reçoivent sous la peau la seconde injection de 2 cent. cubes de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle.

6 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	109 : 50	Polynucléaires	= 2,18	0,94
Nº 62.	—	103 : 50	—	= 2,06	0,89
Nº 1.	—	115 : 50	—	= 2,30	1 »
7 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	84 : 50	Polynucléaires	= 1,68	0,87
Nº 62.	—	81 : 50	—	= 1,62	0,84
Nº 1.	—	96 : 50	—	= 1,92	1 »
8 *septembre.*					
Nº 61.	Bactéries,	252 : 50	Leucocytes	= 5,40	3,23
Nº 62.	—	231 : 50	—	= 4,26	2,96
Nº 1.	—	78 : 50	—	= 1,56	1 »

LAPINS			POUVOIR opsonique.	INDICE opsonique.
9 septembre.				
N° 61.	Bactéries, 414 : 50	Leucocytes	= 8,28	4,86
N° 62.	— 351 : 50	—	= 7,20	4,12
N° 1.	— 85 : 50	—	= 1,70	1 »

Les lapins n°s 61 et 62 sont réinjectés une troisième fois sous la peau avec 3 cent. cubes de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle.

10 septembre.				
N° 61.	Bactéries, 80 : 50	Leucocytes	= 1,60	0,95
N° 62.	— 78 : 50	—	= 1,56	0.92
N° 1.	— 84 : 50	—	= 1.68	1 »
11 septembre.				
N° 61.	Bactéries, 391 : 50	Leucocytss	= 7,82	4,20
N° 62.	— 349 : 50	—	= 6,98	3,75
N° 1.	— 93 : 50	—	= 1,86	1 »
12 septembre.				
N° 61.	Bactéries, 382 : 50	Leucocytes	= 7,64	5,61
N° 62.	— 348 : 50	—	= 6,96	5,11
N° 1.	— 68 : 50	—	= 1,36	1 »

14 septembre.

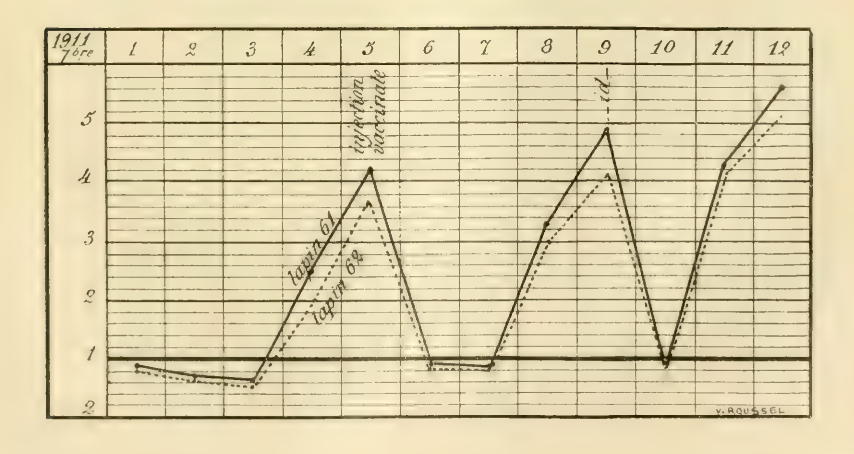
Les lapins n°s 61 et 62, ainsi que deux autres lapins normaux de même poids environ que les deux vaccinés, reçoivent d'abord sous la peau 5 cent. cubes de solution hypertonique de Na Cl à 10 p. 100 et immédiatement après, dans le péritoine, 7/10 d'une culture sur gélose, de vingt-quatre heures, de bacille typhique II, délayée dans de l'eau physiologique.

16 septembre.

Le matin à 9 heures les deux lapins témoins sont morts. A l'autopsie, les cavités péritonéales renferment de la sérosité louche et quelques flocons de fibrine; rate, foie et reins tuméfiés, congestionnés; l'intestin grêle est fortement congestionné et contient un liquide séreux sanguinolent.

Le bacille d'Eberth, à l'aide de la gélose de Drigalski, est isolé du sang, des organes et du contenu intestinal.

Les lapins vaccinés ont résisté aux injections d'épreuve.



EXPÉRIENCE IV

17 *septembre* 1911.

Les lapins nos 63 et 64 (820 et 940 grammes) reçoivent sous la peau 1 cent. cube de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle. Le lapin n° 1 (1.200 grammes) est gardé comme témoin.

LAPINS			POUVOIR opsonique.	INDICE opsonique.
18 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 93 : 50	Polynucléaires =	1,86	0,86
N° 64.	— 97 : 50	— =	1,94	0,89
N° 1.	— 108 : 50	— =	2,16	1 »
19 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 82 : 50	Polynucléaires =	1,65	0,65
N° 64.	— 90 : 50	— =	1,80	0,72
N° 1.	— 125 : 50	— =	2,50	1 »
20 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 67 : 50	Polynucléaires =	1,34	0,58
N° 64.	— 72 : 50	— =	1,44	0,63
N° 1.	— 114 : 50	— =	2,28	1 »
21 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 180 : 50	Leucocytes =	3,60	1,85
N° 64.	— 226 : 50	— =	4,52	2,32
N° 1.	— 97 : 50	— =	1,94	1 »
22 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 442 : 50	Leucocytes =	8,84	4,23
N° 64.	— 512 : 50	— =	10,24	4,87
N° 1.	— 105 : 50	— =	2,10	1 »

Ces mêmes lapins reçoivent sous la peau une seconde dose de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle, dans la quantité de 2 cent. cubes.

23 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 90 : 50	Leucocytes =	1,80	0,86
N° 64.	— 106 : 50	— =	2,12	0,89
N° 1.	— 118 : 50	— =	2,36	1 »
24 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 80 : 50	Leucocytes =	1,60	0,77
N° 64.	— 85 : 50	— =	1,70	0,82
N° 1.	— 103 : 50	— =	2,06	1 »
25 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 311 : 50	Leucocytes =	6,22	2,54
N° 64.	— 410 : 50	— =	8,20	3,36
N° 1.	— 122 : 50	— =	2,44	1 »
26 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 383 : 50	Leucocytes =	7,66	3,94
N° 64.	— 850 : 50	— =	8,08	4,16
N° 1.	— 97 : 50	— =	1,94	1 »

Nouvelle injection sous la peau : 3 cent. cubes de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle.

27 septembre.				
N° 63.	Bactéries, 80 : 50	Leucocytes =	1,60	0,90
N° 64.	— 82 : 50	— =	1,65	0,93
N° 1.	— 88 : 50	— =	1,74	1 »

LAPINS			POUVOIR opsonique.	INDICE opsonique.
—			—	—
28 *septembre.*				
N° 63.	Bactéries, 357 : 50	Leucocytes	= 7,14	3,46
N° 64.	— 416 : 50	—	= 8,32	4 »
N° 1.	— 103 : 50	—	= 2,60	1 »
29 *septembre.*				
N° 63.	Bactéries, 498 : 50	Leucocytes	= 9,96	5,24
N° 64.	— 544 : 50	—	= 10,88	5,72
N° 1.	— 95 : 50	—	= 1,90	1 »

30 *septembre.*

Les lapins n°s 63 et 64, ainsi que deux lapins normaux du poids de 730 et 800 grammes, reçoivent d'abord sous la peau 6 cent. cubes d'eau salée à 10 p. 100, et aussitôt, dans le péritoine, une culture entière de vingt-quatre heures sur gélose, de bacille typhique H, délayée dans de l'eau physiologique.

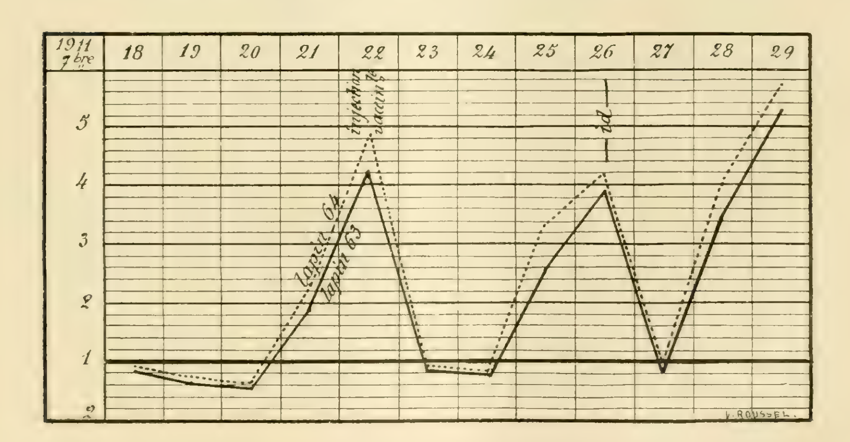
1er *octobre.*

Dans l'après-midi, un lapin témoin est trouvé mort. A l'autopsie, on rencontre les lésions d'une péritonite grave, à bacille d'Eberth.

Le deuxième témoin est trouvé mort le jour suivant; autopsié, on remarque les lésions anatomo-pathologiques de la septicémie éberthienne.

A l'aide de la gélose de Drigalski, on isole le bacille typhique du sang, des organes et du contenu intestinal de ces deux lapins.

Les lapins vaccinés ont survécu aux injections d'épreuve.



Nos expériences montrent donc que, chez les jeunes lapins (de 750 à 1.000 grammes), l'inoculation sous-cutanée de vaccin antityphique de Pfeiffer et Kolle amène, d'une façon constante, une diminution du pouvoir opsonique (phase négative) de leur sang, toujours suivie par une augmentation rapide et considérable si les doses injectées sont appropriées.

La phase négative qui suit la première injection de vaccin, et qui dure un temps variable, de deux à quatre jours, reparaît à l'occasion de la deuxième et de la troisième injection; mais, dans ces deux derniers cas, elle dure moins longtemps et est moins accentuée, ainsi que le montrent les courbes opsoniques que nous donnons plus haut.

Dans la vaccination antityphique des jeunes lapins, le degré du pouvoir opsonique semble être proportionnel au degré de l'immunité par eux acquise.

BIBLIOGRAPHIE

Wright and Douglas. — *Proceed. of the Royal Soc.* London, 1905, vol. LXXIV.

Wright and Douglas. — *The Lancet.* 1905.

Leishman, Harrison, Smallman and Tulloch. — *Journ. of Hyg.* Cambridge, 1905, vol. CCCLXXX.

Charles and Simon. — *Reprint from the Journ. of exper. med.*, 1906.

Hektoen and Ruediger. — *The journ. of Infect. diseases*, vol. II, nº 1.

Harrison (W. S.). — *Journ. of the Royal Army Medical corps.* 1907.

Petit et Breton. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906.

Richardson (M. W.). — *Am. Journ. Med. Sc.*, 1908, vol. CXXXV

Achard et Foix. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1909

Wright. — *Studies on immunisation.* London, 1909.

Coppelli. — *Opsonismo e fagocitismo.* Parma, 1910.

Vincent. — *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, vol. CL.

NOTE SUR UNE LAPINE
NATURELLEMENT RÉFRACTAIRE A LA RAGE

par JULES VIALA,
Préparateur au service antirabique.

M. Pasteur (1) a signalé qu'il existait des chiens résistant, sans préparation, à une sévère inoculation de virus rabique.

Remlinger (2) cite le cas d'un lapin ayant résisté à trois injections de virus fixe dans le cerveau.

Il est extrêmement rare de rencontrer des lapins ne prenant pas la rage à la suite d'une inoculation intra-cranienne de virus rabique. Si, par fortune, on en trouve un qui ne devienne pas rabique après une première inoculation, le plus souvent il contracte la maladie à une deuxième.

Depuis quinze ans que j'inocule des lapins pour les besoins du service antirabique, je n'ai observé qu'un seul animal naturellement et complètement réfractaire à la rage.

Nous avons injecté, le 3 octobre 1909, deux lapins par trépanation avec du virus fixe, l'un prit la rage le 7[e] jour et l'autre, qui était une femelle, résista.

Le 3 novembre, cette lapine est injectée de nouveau, en même temps que deux lapins témoins, qui succombèrent dans le délai habituel.

Le 3 décembre, on fait à cette même lapine une troisième injection intra-cérébrale de virus fixe, laquelle est demeurée également sans résultat.

Ayant eu l'occasion d'avoir de la matière cérébrale provenant d'une personne morte de la rage, nous avons éprouvé la résistance de ce lapin au virus humain.

L'inoculation intra-cérébrale est pratiquée le 3 janvier, les

1) PASTEUR, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. XCVIII, p. 457.
2) REMLINGER, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVII, p. 843.

lapins témoins succombèrent à la rage le 25e jour, et la lapine ne présenta aucun symptôme rabique.

Il nous a paru intéressant de savoir si le sérum de cette lapine neutralisait le virus fixe. Nous avons fait, selon le procédé de A. Marie, un mélange de X gouttes d'émulsion de matière cérébrale d'un lapin ayant succombé au virus fixe et X gouttes de sérum de notre animal réfractaire.

Le lapin inoculé dans le cerveau avec ce mélange n'a présenté aucun symptôme de rage. Un lapin témoin, inoculé de la même façon, avec X gouttes de la même émulsion et X gouttes de sérum normal de lapin, prit la rage le 8e jour.

Le sérum de cette lapine présentait donc un pouvoir bactéricide évident. Nous avons aussi voulu rechercher si cette immunité était héréditaire.

Pour nous placer dans les meilleures conditions, nous avons mis cette femelle avec le lapin mâle qui avait résisté au mélange de virus sérum.

Le 27 mai, elle donna le jour à sept petits : Nous avons éprouvé, quatre et cinq mois après, ces petits lapins par trépanation avec du virus fixe : tous sans exception prirent la rage dans le délai habituel.

Nous aurions voulu pouvoir continuer les expériences d'hérédité avec cette femelle réfractaire, mais elle succomba au cours d'une seconde grossesse.

Chez cette lapine, l'immunité antirabique était-elle naturelle ou était-elle due à quelque circonstance antérieure inconnue de nous, par exemple morsure à la ferme d'élevage par un chien rabique. Il est impossible de le dire, mais la rencontre d'un lapin réfractaire à la rage est assez rare pour être signalée.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE · AVRIL 1912 · N° 4

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ACTION DU MANGANÈSE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'ASPERGILLUS NIGER

par Gabriel BERTRAND et M. JAVILLIER.

L'influence favorable exercée sur la croissance des végétaux par l'introduction, même à l'état de traces, dans le sol ou les milieux de culture, de certains éléments chimiques, comme le manganèse, le bore, le zinc, etc., qui ne se rencontrent, en général, dans les plantes qu'en très petites proportions, est démontrée aujourd'hui par de nombreuses expériences, entreprises tant au laboratoire que dans la grande culture. L'emploi de plusieurs de ces éléments, en addition aux engrais ordinaires, a pu, dès lors, être proposée avec succès par l'un de nous qui a désigné ces engrais nouveaux, à cause de leur rôle probable, sous le nom d'*engrais catalytiques* (1). C'est ainsi que le manganèse, principalement à l'état de sulfate ou de carbonate, a déjà pris une place intéressante dans la pratique agricole.

Nous nous sommes demandé si l'influence exercée séparément par divers éléments catalytiques était cumulative, c'est-à-dire s'il était possible, en ajoutant à la fois deux ou trois de ces éléments, d'obtenir des augmentations de récolte supérieures à celles que l'on obtient par l'addition d'un seul. Il y

(1) Gab. Bertrand, Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLI, p. 1255; 1905. — Le manganèse dans la nature. *Rev. gén. de Chim.*, t. VIII, p. 205; 1905. — Sur les engrais catalytiques. *Comptes rendus des Congrès de Chim. appliquée de Berlin*, 1903, *de Rome*, 1906, *et de Londres*, 1909.

avait là, en effet, un problème de grand intérêt au point de vue théorique comme au point de vue pratique.

Pour arriver à une solution satisfaisante, nous nous sommes adressés, en ce qui concerne la plante, à l'*Aspergillus niger* v. Tieg., et, en ce qui concerne les éléments catalytiques, au zinc et au manganèse. L'*Aspergillus* offre l'avantage de pouvoir être cultivée en toutes saisons et de fournir, en peu de temps, des récoltes assez abondantes et très régulières. En outre, l'influence exercée sur cette moisissure par l'un des éléments que nous nous proposions d'étudier, le zinc, est déjà bien connue depuis les recherches de Raulin (1), étendues et précisées par l'un de nous (2). Quant au manganèse, nous l'avons choisi parce que son action avait été examinée antérieurement par certains auteurs (3). Néanmoins, comme une lecture attentive des travaux publiés à ce dernier sujet faisait naître quelques critiques et ressortir d'importantes lacunes, nous avons dû, avant d'aborder le problème que nous voulions résoudre, reprendre l'étude particulière de l'action du manganèse sur l'*Aspergillus niger*. Ce sont les résultats de cette étude préliminaire que nous donnons dans le présent mémoire.

Au début de ses recherches sur l'alimentation minérale de l'*Aspergillus niger*, en 1863, Raulin considérait le manganèse comme un élément très utile et presque nécessaire au développement de la moisissure (4). Dans la suite, ce savant découvrit l'importance, passée d'abord inaperçue, du fer et du zinc, et il n'obtint plus, avec le manganèse, que des résultats inconstants. « Faut-il en conclure, écrit-il dans sa thèse (5), que les sels de

(1) Etudes chimiques sur la végétation. *Thèse doct. ès sc.* Paris, 1870.

(2) M. Javillier, Sur l'influence favorable de petites doses de zinc sur la végétation du Sterigmatocystis nigra. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLV, p. 1212; 1907. — Sur la fixation du zinc par le Sterigmatocystis nigra. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLVI, p. 365; 1908. — Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. *Thèse doct. Sc.*, Paris 1908. — Le zinc chez les plantes. Ces *Annales*, t. XXII, p. 720; 1908.

(3) En particulier, Richards, *Jahresb. wiss. Bot.*, t. XXX, p. 665; 1897; Kanter, *Diss.* Saint-Pétersbourg, 1903; Gössl, voir ci-après.

(4) Etudes chimiques sur la végétation des Mucédinées, particulièrement de l'*Ascophora nigrans*. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. LVII, p. 228; 1863.

(5) *Thèse* citée, p. 168.

manganèse ont agi par les sels de fer ou de zinc qu'ils pouvaient contenir ou bien que le manganèse remplace le fer (ou même le zinc) physiologiquement, comme il le remplace souvent dans les réactions chimiques? » « Je ne saurais, ajoute-t-il, me prononcer à cet égard » ; et c'est sans doute par suite de cette indécision que Raulin ne fit pas figurer le manganèse dans la formule définitive de son milieu de culture.

Gössl (1), en 1905, en ajoutant des doses croissantes de sulfate de manganèse à des cultures d'*Aspergillus niger* ou de *Penicillium glaucum*, a obtenu, avec des milieux de composition variable : sucrés, peptonés, glycérinés, des augmentations croissantes de récolte. Toutefois, cet expérimentateur ne s'est pas mis en garde contre les causes d'erreur signalées par Raulin; il a utilisé des « sels purs » du commerce, sans ajouter s'il avait vérifié leur degré de pureté et, notamment, l'absence complète du zinc dans le sulfate de manganèse.

Les produits dont nous nous sommes servis dans nos propres expériences avaient été examinés au point de vue de la présence du zinc. En ce qui concerne particulièrement le sulfate de manganèse, bien que notre méthode de recherche du zinc (2), appliquée à 10 grammes de sulfate pur de manganèse du commerce, ne nous ait pas apporté la certitude de la présence du zinc (3), il nous a paru utile, dans nos dernières expériences, de le préparer nous-mêmes en partant du permanganate de potassium pur. Le permanganate a d'abord été recristallisé ; les cristaux ont ensuite été dissous et la dissolution traitée par un courant de gaz sulfureux jusqu'à décoloration. Le bioxyde précipité a été lavé à fond par une série de délayages dans l'eau pure (redistillée dans le vide avec un appareil en verre), suivis de centrifugations; il a été finalement remis en suspension dans l'eau et redissous par un courant d'anhydride sulfureux.

(1) Ueber das Vorkommen des Mangans in der Pflanze. *Beihefte z. bot. Centralbl.*, t. XVIII, 1re partie, p. 119 ; 1905.

(2) *Bull. Soc. chim.*, 4e série, t. I, p. 63 ; 1907, et t. III, p. 114 ; 1908.

(3) Lorsqu'on précipite la solution de sulfate de manganèse par l'eau oxygénée et l'ammoniaque, l'oxyde de manganèse précipité peut entraîner partie ou totalité du zinc; lorsqu'il y a une énorme disproportion entre les quantités de manganèse et de zinc, ce dernier n'étant qu'à l'état de traces, on peut alors craindre de ne pas réaliser une complète séparation des éléments en faisant même une série de redissolutions et de reprécipitations.

La liqueur a été concentrée pour faire cristalliser le sulfate de manganèse.

Il importait aussi que les diverses substances chimiques entrant dans la composition du milieu de Raulin fussent exemptes de manganèse. Or, l'examen de ces substances, bien que nous nous adressions à des produits commerciaux purs, nous a montré que plusieurs d'entre elles renfermaient des quantités appréciables de manganèse. C'était le cas, en particulier, pour le carbonate de magnésium et le sulfate ferreux. Devant la difficulté d'éliminer rigoureusement le manganèse de ces deux sels, nous leur avons substitué le sulfate de magnésium et le sulfate ferrico-ammonique, qu'il est plus aisé d'obtenir purs. La formule de Raulin a dû, par suite, subir une modification ; elle est devenue la suivante :

Eau	1.000 gr. »
Sucre	46 gr. 6
Acide tartrique	2 gr. 66
Carbonate de potassium	0 gr. 40
Nitrate d'ammonium	2 gr. 66
Phosphate d'ammonium	0 gr. 40
Sulfate d'ammonium	0 gr. 155
Sulfate de magnésium	0 gr. 710
Alun de fer	0 gr. 081
Silicate de potassium	0 gr. 046

Des recherches entreprises récemment sur des quantités suffisantes de matière première nous ont montré que le nitrate d'ammonium, le phosphate d'ammonium et le saccharose que nous utilisions n'étaient pas non plus rigoureusement exempts de manganèse. Le taux d'impureté était de l'ordre du 100.000.000^e pour le sucre, du 10.000.000^e pour le nitrate d'ammonium, du 1.000.000^e pour le phosphate. Nous devons dire que nos expériences ont été réalisées avec ces corps, mais on voit que la proportion de maganèse qui a pu, de ce chef, être introduite dans les milieux témoins était d'une extrême petitesse, puisqu'elle n'atteignait pas 1/5.000^e de milligramme par 100 cent. cubes de liquide.

Il existait d'ailleurs une autre cause d'introduction de manganèse : c'était l'attaque des vases mêmes de culture par le liquide porté, au moment de la stérilisation, à la température de + 120 degrés. Une expérience conduite dans le but d'appré-

cier la quantité de manganèse qui pouvait être introduite par cette voie dans le milieu de culture nous a montré qu'elle atteignait environ le double de la précédente. Naturellement, cette quantité variait avec la richesse du verre en manganèse et sa plus ou moins grande attaquabilité par le milieu de culture. C'est en nous appuyant sur ces causes que nous expliquons la présence de manganèse à l'état de traces très petites et de grandeur variable dans nos cultures-témoins (1).

Nos expériences ont été réalisées dans des conditions diverses, tant au point de vue de la température (27, 31, 32, 33 degrés) que de la nature des vases (matras de 2 litres, fioles coniques de Bohême de 1 litre et demi, flacons cylindriques en verre vert de 500 cent. cubes) et du volume du liquide de culture (100,250,500 cent. cubes). Le liquide était réparti dans les récipients, stérilisé par chauffage à + 120 degrés pendant vingt minutes, ensemencé largement avec les conidies d'une culture récente d'*Aspergillus*; les vases étaient placés dans une chambre thermostat où la température était aussi régulière que possible. En général, on mettait en séries plusieurs témoins et plusieurs vases correspondant à chaque dose de manganèse expérimentée, de façon à atténuer les différences individuelles. Les chiffres donnés dans les tableaux sont alors des moyennes.

	POIDS SEC des récoltes.
Exp. 1. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes. Temp., + 27 degrés. Durée de la culture : 6 jours.	
Culture témoin	1 gr. 72
Culture en présence de 1/10.000 Mn	2 gr. 65
Exp. 2. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes. Temp., + 31 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	2 gr. 10
Culture en présence de 1/10.000 Mn	2 gr. 90
Exp. 3. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes. Temp., + 33 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	1 gr. 70
Culture en présence de 1/2.500 Mn	2 gr. 72
Exp. 4. — Fioles coniques de 1 l. 1/2. Milieu : 250 c. c. Temp., + 31 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	2 gr. 49
Culture en présence de 1/5.000	4 gr. 34

(1) Comme on le verra plus loin, les quantités de manganèse dans les cultures témoins ont varié de 1 à 9 millièmes de milligramme.

	POIDS SEC des récoltes.
Exp. 5. — Fioles coniques de 1 l. 1/2. Milieu : 500 c.c. Temp., + 33 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	3 gr. 40
Culture en présence de 1/2.500 Mn	4 gr. 69

Sept expériences ont été réalisées dans des conditions diverses pour observer l'influence de doses croissantes de manganèse et rechercher quelle dose de métal provoque les récoltes les plus abondantes. Il paraîtra suffisant de consigner ici quatre d'entre elles.

	POIDS SEC des récoltes.
Exp. 6. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes Temp., + 32 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	2 gr. 28
Culture en présence de 1/100.000 Mn	2 gr. 98
— — de 1/50.000 Mn	3 gr. 01
— — de 1/25.000 Mn	3 gr. 18
— — de 1/10.000 Mn	3 gr. 31
— — de 1/5.000 Mn	3 gr. 64
— — de 1/1.000 Mn	4 gr. 02
— — de 1/500 Mn	4 gr. 03
— — de 1/250 Mn	3 gr. 82
— — de 1/100 Mn	3 gr. 90
— — de 1/50 Mn	2 gr. 76
Exp. 7. — Fioles coniques de 1 l. 1/2 Milieu : 500 c.c. Temp., + 33 degrés. Durée de la culture : 100 heures.	
Culture témoin	2 gr. 80
Culture en présence de 1/500.000 Mn	2 gr. 88
— — de 1/100.000 Mn	3 gr. 16
— — de 1/50.000 Mn	3 gr. 43
— — de 1/25.000 Mn	3 gr. 55
— — de 1/10.000 Mn	4 gr. 40
— — de 1/5.000 Mn	4 gr. 23
— — de 1/1.000 Mn	3 gr. 75
— — de 1/500 Mn	4 gr. 60
Exp. 8. — Matras de 2 litres. Milieu : 250 cent. cubes. Temp., + 32 degrés. Durée de la culture : 4 jours.	
Culture témoin	1 gr. 33
Culture en présence de 1/500.000 Mn	1 gr. 49
— — de 1/250.000 Mn	1 gr. 63
— — de 1/100.000 Mn	1 gr. 70
— — de 1/25.000 Mn	1 gr. 19
— — de 1/10.000 Mn	2 gr. 38
— — de 1/2.500 Mn	2 gr. 70
— — de 1/500 Mn	2 gr. 76
— — de 1/200 Mn	3 gr. 51
— — de 1/100 Mn	3 gr. 39

Pour donner un aperçu des variations individuelles et

montrer la nécessité d'opérer en séries, nous consignons, à côté des poids moyens, les poids minima et maxima obtenus dans cette expérience.

Exp. 9. — Flacon de 500 cent. cubes. Milieu : 100 cent. cubes. Temp., + 31 degrés. Durée de la culture : 5 jours.

	POIDS minima.	POIDS maxima.	POIDS moyens.
Cultures témoins.	0 gr. 585	0 gr. 625	0 gr. 610
Cultures en présence de 1/1.000.000 Mn.	0 gr. 605	0 gr. 680	0 gr. 631
— — de 1/500.000 Mn .	0 gr. 600	0 gr. 680	0 gr. 637
— — de 1/100.000 Mn .	0 gr. 655	0 gr. 700	0 gr. 680
— — de 1/10.000 Mn . .	0 gr. 660	0 gr. 750	0 gr. 687
— — de 1/1.000 Mn . .	0 gr. 665	0 gr. 735	0 gr. 7[illegible]0
— — de 1/500 Mn. . . .	0 gr. 755	0 gr. 810	0 gr. 782
— — de 1/333 Mn. . . .	0 gr. 735	0 gr. 850	0 gr. 803
— — de 1/200 Mn. . . .	0 gr. 800	1 gr. 045	0 gr. 951
— — de 1/100 Mn. . . .	0 gr. 840	1 gr. 125	0 gr. 982
— — de 1/50	?	»	0 gr. 170

Ces résultats montrent que le manganèse possède réellement une influence favorable sur le développement de l'*Aspergillus niger*. L'existence d'un « zone optima » de concentration, si nette dans le cas du zinc avec l'*Aspergillus* (1), dans celui du bore avec les phanérogames (2), est ici fort imprécise. Les récoltes augmentent d'abord assez vite avec la proportion du manganèse, puis de plus en plus lentement. Elles ne diminuent qu'en présence de très grandes quantités de métal. Mais, à ce moment, il faut sans doute attribuer le fléchissement de la courbe représentative du phénomène plutôt à l'action nuisible d'une trop forte pression osmotique qu'à l'influence, devenue nocive, du manganèse.

L'attention doit donc surtout se porter, au point de vue de la démonstration du rôle favorable exercé par le manganèse, sur les résultats obtenus avec de très petites doses. Dans ce cas, en effet, l'influence adventice des impuretés, s'il en est introduit avec le sel de manganèse, devient tout à fait négligeable. D'autre part, l'augmentation du soufre apporté avec le manganèse n'entre plus en ligne de compte, car il y a déjà, dans les témoins eux-mêmes, un excès important de soufre disponible.

(1) M. Javillier, *Thèse* citée, p. 63-71.

(2) H. Agulhon, Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux. *Thèse doct. ès sc.*, Paris 1910.

Le manganèse possède également une action qui, sans être très marquée, est cependant sensible sur la formation des conidies, autant qu'on en peut juger par la coloration des cultures. Les *Aspergillus* cultivés sur des doses moyennes de ce métal (1/25.000 à 1/1.000) sont, à l'arrêt des cultures, sensiblement plus noires que les *Aspergillus* témoins, d'une part, et les *Aspergillus* plus riches en manganèse, d'autre part.

Il faut nous demander maintenant dans quelle mesure l'*Aspergillus* fixe le manganèse qui lui est offert. Le fixe-t-il en totalité, au moins pour les petites doses, et se comporte-t-il, vis-à-vis de ce métal comme vis-à-vis du zinc?

Nous avons fait, pour éclairer ce point, des séries de dosages de manganèse dans des myceliums secs.

MANGANÈSE introduit.	DILUTION du manganèse 1 sur :	POIDS secs.	POIDS des cendres.	MANGANÈSE fixé.	MANGANÈSE p. 100 de matière sèche.
Exp. 5 (*).					
Témoin.	»	3 gr. 40	0 gr. 108	0 mg. 003	0,00008
200 mg.	2.500	4 gr. 69	0 gr. 1479	1 mg. 25	0,0266
Exp. 8.					
Témoin.	»	1 gr. 331	0 gr. 0393	0 mg. 001	0,00006
0 mg. 5	500.000	1 gr. 490	0 gr. 0469	0 mg. 030	0,0020
1 mg.	250.000	1 gr. 635	0 gr. 0526	0 mg. 036	0,0022
2,5	100.000	1 gr. 700	0 gr. 0552	0 mg. 056	0,0032
10	25.000	2 gr. 190	0 gr. 0710	0 mg. 106	0,0048
25	10.000	2 gr. 380	0 gr. 0744	0 mg. 1[illegible]0	0,[illegible]080
100	2.500	2 gr. 700	0 gr. 0821	0 mg. 700	0,02[illegible]8
500	500	2 gr. 765	0 gr. 0907	4 mg. 100	0,145
1.250	200	3 gr. 510	0 gr. 1272	10 mg. 006	0,285
2.500	100	3 gr. 390	0 gr. 1465	22 mg. 000	0,649
Exp. 9.					
Témoin.	»	0 gr. 610	0 gr. 0227	0 mg. 0090	0,0015
0 mg. 1	1.000.000	0 gr. 631	0 gr. 0241	0 mg. 0112	0,0018
0,2	500.000	0 gr. 637	0 gr. 0254	0 mg. 0126	0,0020
1	100.000	0 gr. 680	0 gr. 0256	0 mg. 0182	0,0026
10	10.000	0 gr. 687	0 gr. 0253	0 mg. 104	0,015
100	1.000	0 gr. 700	0 gr. 0253	1 mg. 08	0,154
200	500	0 gr. 782	0 gr. 0294	2 mg. 2	0,281
300	333	0 gr. 803	0 gr. 0317	3 mg. 6	0,448
500	200	0 gr. 951	0 gr. 0385	5 mg. 0	0,526
1.000	100	0 gr. 982	0 gr. 0470	8 mg. 5	0,863
2.000	50	0 gr. 170	0 gr. 0119	1 mg. 06	0,622

(*) Conditions expérimentales précédemment indiquées. Dans la note des *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, dont ce mémoire est le développement (t. CLII, p. 225; 1911), les quantités de manganèse fixées ont été, par erreur, réduites de moitié.

Ceux-ci étaient incinérés; les cendres étaient sulfatées de façon à faire disparaître toute trace de charbon, et le dosage effectué colorimétriquement, après transformation du manganèse en acide permanganique, suivant une technique dont le détail a été donné antérieurement par l'un de nous (1).

Ces résultats prouvent, tout d'abord, que du manganèse est fixé par la plante. Les augmentations de récolte dans les milieux manganésés ne sont pas seulement dues à la présence du manganèse dans le liquide; le métal pénètre dans la cellule, où il joue, sans doute, un rôle actif dans le processus d'assimilation des aliments.

Les quantités de manganèse fixées par la moisissure sont très éloignées de celles qui lui sont offertes; dans aucun des cas ci-dessus, même celui des plus petites doses, et contrairement à ce qui a été observé au sujet du zinc (2), l'*Aspergillus* n'a fixé la totalité du métal. Si l'utilisation du manganèse par les plantes supérieures a lieu de la même manière, on s'explique aisément les effets avantageux obtenus en ajoutant du manganèse à des sols qui en renferment déjà une proportion notable, même sous une forme assimilable.

On voit aussi que les quantités de manganèse fixées sont, à partir d'une certaine dose, sensiblement proportionnelles aux quantités de métal introduites. Dès ce moment, il est vraisemblable que la totalité du manganèse n'est pas physiologiquement utilisée et qu'au moins une partie se fixe sur les membranes, soit par quelque phénomène de teinture, soit par formation d'une combinaison insoluble. On peut se demander aussi quelle part les conidies prennent dans cette fixation; cette part est-elle, proportionnellement à leur poids, plus élevée que celle du mycélium? Il se présente à ce sujet un certain nombre de problèmes que nous étudions actuellement. Mais nous sommes, dès maintenant, suffisamment renseignés sur l'action propre du manganèse pour pouvoir aborder utilement l'étude de l'action simultanée de cet élément et du zinc; c'est ce que nous ferons dans un prochain mémoire.

(1) Gab. Bertrand, *Bull. Soc. chim.*, 4e série, t. IX, p. 361; 1911.
(2) M. Javillier, *Thèse* citée, p. 75.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

ENTREPRISES A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS PENDANT L'ANNÉE 1911

(TROISIÈME MÉMOIRE)

Ce troisième mémoire apporte la constatation d'un fait utile, la sensibilité du cobaye au virus exanthématique. Il contient, en outre, des données nouvelles sur le siège de l'agent inconnu du typhus et sur les conditions de l'immunité vis-à-vis de la maladie expérimentale. Enfin, on y trouvera les résultats de quelques essais thérapeutiques.

I

LE TYPHUS EXPÉRIMENTAL DU COBAYE

par CHARLES NICOLLE, E. CONSEIL et A. CONOR.

Lorsqu'on inocule, dans la cavité péritonéale de plusieurs cobayes d'un même lot, des quantités variables (8, 6, 4, 3, 2 cent. cubes) du sang d'un malade atteint de typhus exanthématique, une part de ces animaux succombe en quelques jours dans l'amaigrissement et l'hypothermie, avec parfois des paralysies; ce sont ceux qui ont reçu les doses les plus élevées. Les autres, au contraire, inoculés de quantités faibles (3,2 cent. cubes), ne présentent d'ordinaire aucun symptôme apparent, tout au plus une perte de poids peu importante et passagère. Cependant, si l'on prend la température de ces cobayes qui n'ont témoigné d'aucune réaction objective, on constate que, chez certains, non chez tous, il se produit une fièvre de quelques jours, comparable à celle que montrent les singes témoins, inoculés du même sang et atteints du typhus expérimental le plus net.

Ces faits nous avaient frappés au cours de nos travaux de

1910 et nous avions déjà pu nous convaincre de la réalité de l'infection de certains cobayes, inoculés dans ces conditions, par le résultat positif d'un passage de cobaye à singe. Mais d'autres recherches nous absorbaient alors et M. Roux, mis au courant de nos expériences, nous avait très judicieusement conseillé d'en remettre à plus tard l'étude complète et la publication. Nous nous étions contentés d'une allusion à ces faits dans notre précédent mémoire (1).

Nous avons repris en 1911 nos recherches et nous en avons signalé les premiers résultats dans une note à l'*Académie des Sciences* (séance du 6 juin 1911, p. 1632). Ces expériences sont décisives : Sans présenter la grande sensibilité du singe, qui demeure l'animal réactif du typhus exanthématique, le cobaye offre une sensibilité suffisante vis-à-vis de cette infection pour qu'elle puisse être mise utilement à profit dans les recherches expérimentales ultérieures, en particulier pour la conservation du virus.

Le typhus du cobaye se résume en une élévation de la température d'une durée de quelques jours. Sans le secours du thermomètre, la maladie passerait inaperçue. L'incubation en est variable : sept à seize jours. Certains cobayes ne réagissent pas ; d'autres ne présentent qu'une réaction douteuse ; dans les cas les plus nets, la fièvre dure de quatre à onze jours, le thermomètre peut atteindre alors et dépasser 41 degrés. L'examen des courbes reproduites plus loin donnera de la fièvre exanthématique du cobaye une idée plus exacte que ne le ferait une description difficile et oiseuse. Dans quelques cas, on note, à la fin de la période fébrile, un amaigrissement léger ; il n'y a jamais hypothermie consécutive ; le retour intégral à la santé suit immédiatement la chute thermique. Si un grand nombre de nos cobayes sont morts en cours d'expérience, cette terminaison est la conséquence de ponctions cardiaques destinées au prélèvement du sang pour les passages. Deux de ces animaux, cependant, semblent avoir succombé à l'infection : l'un au cinquième jour de la fièvre, l'autre au premier jour de l'apyrexie ; leur autopsie n'a montré aucune lésion apparente

(1) Ces *Annales* : Recherches expérimentales sur le typhus exanthématique entreprises à l'Institut Pasteur de Tunis pendant l'année 1910 (Deuxième mémoire, p. 130 et 136).

des organes. Nous n'avons pratiqué sur aucun cobaye d'examens histologiques du sang.

Il nous a été possible de réaliser deux fois deux passages par cobaye et une fois trois ; nous n'avons pu dépasser ce chiffre, soit que les doses inoculées fussent trop faibles, soit que le virus avec lequel nous opérions ait été trop peu actif. Pour juger la question, il eût fallu employer à chaque passage un plus grand nombre de cobayes que nous ne l'avons fait, une forte proportion de ces animaux ne présentant à l'inoculation qu'une réaction faible et douteuse. Il y a là une précaution indispensable que les expérimentateurs futurs devront connaître et suivre. Il ne nous a pas paru que les passages par cobaye diminuaient ou augmentaient la virulence du sang pour cet animal ou pour le singe.

L'examen des observations qui suivent et du tableau général qui les accompagne démontre que l'infection transmise au cobaye dans nos expériences est bien le typhus ; on y lira en effet qu'au 1er passage le sang d'un malade a contaminé deux cobayes et un singe neufs, mais non un singe vacciné par une atteinte antérieure de typhus ; que le sang d'un des deux cobayes infectés s'est montré virulent pour un singe et a fourni ensuite une longue série de passages alternatifs, par cobayes et singes, et que le singe infecté avec le sang du malade (bonnet 64) a contracté une immunité consécutive vis-à-vis de l'inoculation ultérieure du virus passé par le cobaye. L'ensemble de ces expériences suffit à trancher définitivement la question.

Au total, nos essais nous ont fourni pour la plus longue lignée *10 passages*, représentés par la série suivante : malade, cobaye, singe, cobaye, cobaye, singe, cobaye, singe, singe, cobaye, singe et cobaye. Nous avons interrompu volontairement nos expériences ; au dernier passage par singe, l'activité du virus était la même qu'au début. Nul doute qu'on puisse, au moyen de passages alternatifs par cobayes et singes, conserver indéfiniment le virus exanthématique dans les laboratoires ; cette constatation est de nature à rendre plus commode et moins coûteuse l'étude de la maladie.

Dans le typhus expérimental du cobaye, comme dans celui du singe, *le sang est virulent* (de façon constante pour le singe, animal réactif, et souvent aussi pour le cobaye, animal moins

sensible), *du début de la fièvre jusqu'au dernier jour de celle-ci.* En outre, *une expérience nous a montré la présence du virus dans le sang de ceux-là mêmes de nos cobayes qui ne présentaient aucune réaction thermique, au moment où d'autres animaux* (singes ou cobayes), *inoculés en même temps et avec le même virus, présentaient une fièvre typique.* En effet, le sang du cobaye 75, inoculé du virus du bonnet 70, comme le cobaye 72 et le bonnet chinois 71 qui ont réagi de façon classique, s'est montré virulent au 14[e] jour après l'inoculation, en dehors de toute manifestation thermique.

Le fait est trop intéressant dans sa portée générale pour que nous croyions utile d'y insister davantage.

Ce chapitre était rédigé lorsque nous avons eu connaissance des travaux de Gaviño et Girard sur le même sujet. Ils confirment exactement les nôtres; plus heureux cependant, ces savants ont pu réaliser jusqu'à 11 passages par cobaye. Ce résultat est dû peut-être à une plus grande activité du virus de la maladie mexicaine (*Tabardillo*), à tous autres points de vue identique au virus africain; cette différence dans la virulence n'aurait rien que de naturel, le typhus étant probablement en Amérique d'importation relativement récente, tandis que, dans nos régions, où il sévit sur la population autochtone depuis les débuts de l'histoire, la résistance des indigènes, issus de parents si souvent atteints, a pu atténuer ses propriétés pathogènes.

Nos constatations et celles de Gaviño et Girard n'ont rien de comparable aux faits signalés par Pignet (1). Cet auteur expérimentant sur le lapin et le cobaye, avec des poux infectés ou le sang de malades (frictions sur la peau rasée ou inoculation sous-cutanée), a noté des accidents paralytiques, la cachexie et la mort rapide ou lointaine. Il est probable qu'une part de ces accidents relève de l'action toxique du sang humain. Ceux de nos cobayes qui ont reçu des doses trop fortes de sang sont morts en quelques jours, avons-nous dit, de cachexie et d'hypothermie, ainsi que meurent fréquemment les cobayes inoculés de doses semblables de sang humain sain, et c'est au con-

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, 8 décembre 1909, p. 564-567.

traire parmi ceux qui ne présentaient rien d'anormal que le thermomètre a permis de déceler l'infection exanthématique. Or, Pignet n'a pas fait d'observations thermiques.

Il est à noter que Ricketts et Wilder ont montré la sensibilité du cobaye au virus de la fièvre tachetée des Montagnes rocheuses, maladie qui n'est pas sans analogie avec le typhus exanthématique.

Pièces justificatives.

Nous ne rapportons ici qu'une seule série d'expériences pratiquées en partant d'un seul malade. Les résultats ont été identiques avec des virus de souches différentes (Epidémies de 1910 et de 1911, Le Djouggar et Tunis).

Des expériences antérieures, qu'il nous paraît inutile de rapporter ici, nous avaient prouvé que l'inoculation péritonéale de sang humain normal, à la dose de 2 à 4 cent. cubes, ne donnait au cobaye aucune élévation thermique.

Le malade qui a servi de point de départ à nos expériences se trouvait, au moment où nous avons prélevé sur lui le virus, *au 11e jour d'un typhus exanthématique grave* (malade 51, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux). Dix passages ont été réalisés avec son virus en alternant, comme il suit, cobayes et singes. Le sang a été dans tous les cas recueilli par ponction cardiaque et les inoculations pratiquées dans la cavité péritonéale des singes et cobayes.

PASSAGE I

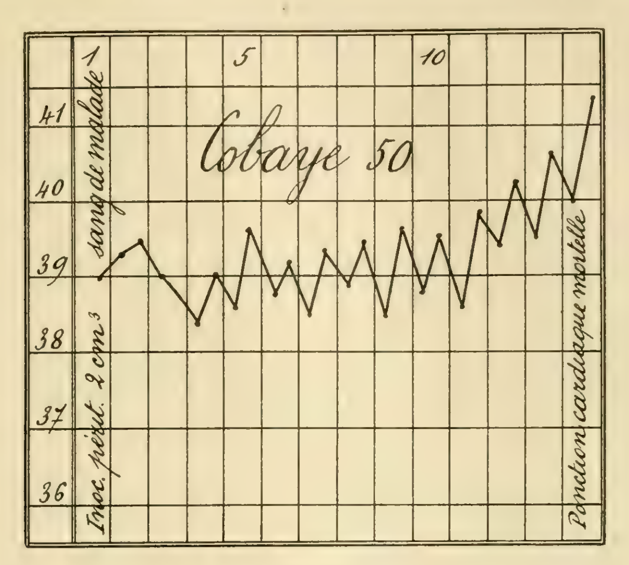
Cobaye 50 (Courbe 1), reçoit, le 17 mars 1911, 2 cent. cubes de sang du malade précédent. La température de ce cobaye, prise deux fois par jour depuis un mois, oscillait de façon régulière entre 38°5 et 39°5.

L'inoculation n'a été suivie chez lui d'aucun symptôme immédiat ; mais, après 10 *jours d'incubation*, la *fièvre* s'est élevée progressivement pour atteindre 41°3 au soir du 14e jour. A ce moment, nous pratiquons sur lui une ponction cardiaque pour l'inoculation du bonnet chinois 70 ; cette ponction est rapidement suivie de la mort du cobaye. En dehors de la température, nous n'avions noté sur lui aucun symptôme ; l'autopsie a donné un résultat négatif.

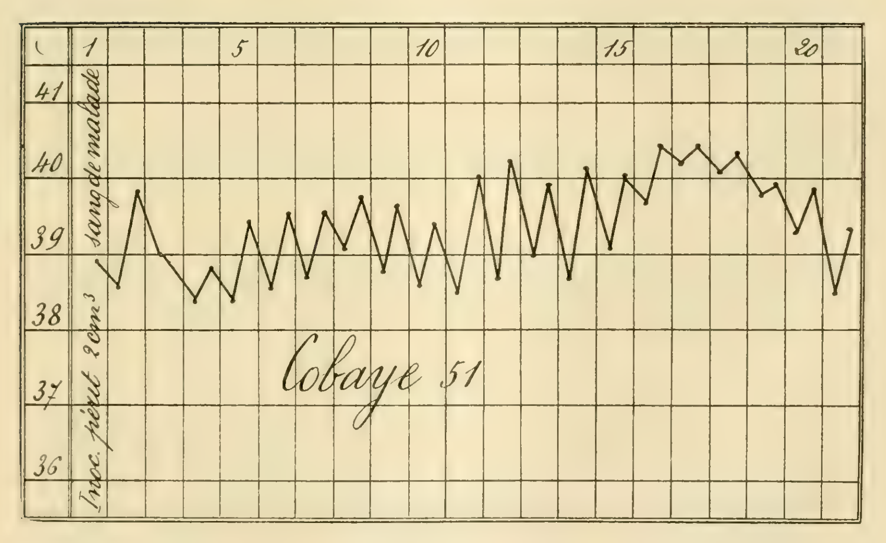
Cobaye 51 (Courbe 2), inoculé en même temps que le cobaye 50, avec une dose identique du même virus.

Ce cobaye a présenté une *réaction fébrile légère* du 15e au 19e jour. Réino-

culé le 8 juin, soit 83 jours après la première inoculation, avec le sang du bonnet chinois 88, au 9e jour d'une infection sévère, il n'a pas réagi



Courbe 1.



Courbe 2.

(Témoins les bonnets 68, 77 et 82 qui ont contracté un typhus classique. Voir plus loin).

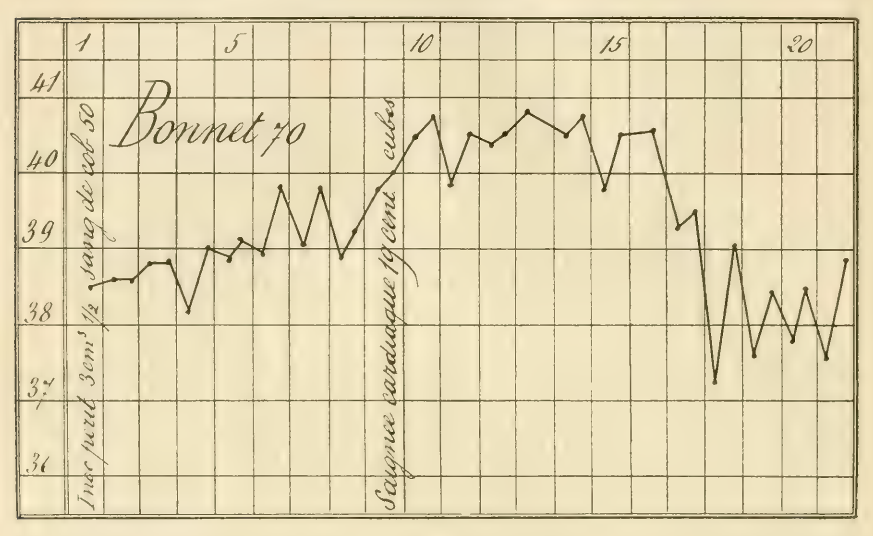
1er *Témoin* : *Bonnet chinois* 64, a reçu le même jour 4 cent. cubes de sang

du même malade. *Incubation* 6 *jours*, *typhus classique de* 10 *jours* de durée.

2e *Témoin* : *Bonnet chinois* 42, vacciné par une atteinte antérieure en août 1910, reçoit 5 cent. cubes de sang du malade. *Réaction nulle.*

PASSAGE II

Bonnet chinois 70 (Courbe 3), inoculé le 30 mars avec 3 cent. cubes 1/2 de sang du cobaye 50, prélevé par ponction cardiaque au 4e jour de son infection (température 41°3). Ce singe a contracté un typhus grave. *Incubation* 5 *jours*, *fièvre de* 12 *jours* de durée, suivie de 4 jours d'hypothermie. Une ponction cardiaque, pratiquée au 4e jour de l'infection du bonnet chinois 70, a permis



Courbe 3.

le passage au bonnet 71 témoin et aux cobayes neufs 72, qui a réagi, et 75, dont la température n'a point été influencée et dont le sang cependant s'est montré virulent (Voir plus bas); d'autre part, le bonnet 64, vacciné par une atteinte antérieure, a résisté.

PASSAGE III

Cobaye 72 (Courbe 4), inoculé le 7 avril avec 4 cent. cubes de sang du bonnet 70, au 4e jour d'un typhus grave. *Incubation* 11 *jours*, *fièvre élevée*, *d'une durée de* 10 *jours*, mort spontanée au 1er jour de l'apyrexie.

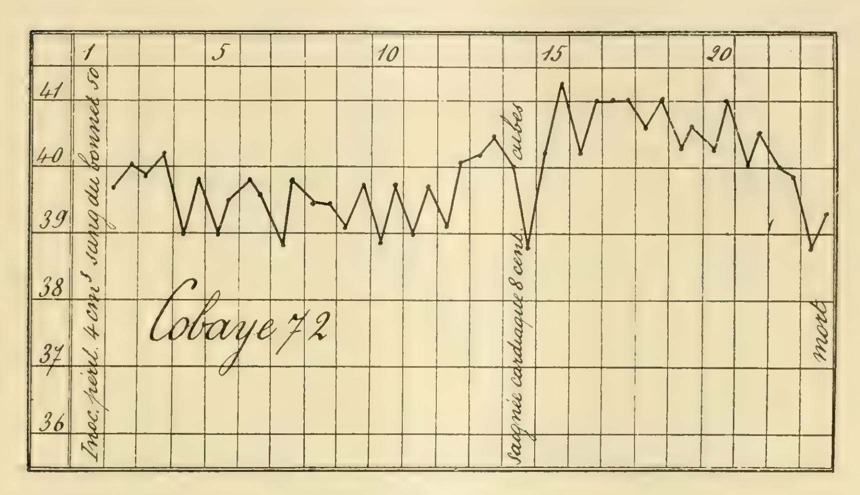
A l'autopsie de cet animal, on note des adhérences récentes, mais déjà organisées, des divers viscères abdominaux (foie, rate, estomac), et consécutives à l'inoculation du sang, quelques taches ecchymotiques sur l'intestin grêle et la vessie et une hypertrophie considérable des capsules surrénales. Les poumons sont sains, la rate et le foie petits.

Au 3e jour de la fièvre, nous avions pratiqué sur ce cobaye une ponction cardiaque de 8 cent. cubes, non mortelle et suivie d'une chute momentanée

de la température. Le sang prélevé a été utilisé pour l'inoculation des cobayes 78 et 79 et du bonnet chinois 76 (Voir 4e passage).

Cobaye 75, inoculé en même temps que le cobaye 72 avec une dose identique du même sang. Ce cobaye n'avait présenté *aucune réaction thermique*, lorsqu'il est mort, au 14e jour, des suites d'une ponction cardiaque. Nous jugeons inutile de reproduire sa courbe thermométrique absolument normale.

Le sang de cet animal s'est montré virulent pour le bonnet 77 et non pour les cobayes 81 et 89 (Voir plus bas, 4e passage).



Courbe 4.

Témoin : *Bonnet chinois* 71, inoculé en même temps que les cobayes 72 et 75 avec 4 cent. cubes de sang du bonnet 70. *Incubation* 8 *jours*, *typhus très grave d'une durée de* 12 *jours*, suivi d'hypothermie.

PASSAGE IV. — Ligne issue du cobaye 72.

Cobaye 78 (Courbe 5), inoculé le 20 avril avec 2 cent. cubes de sang du cobaye 72 au 3e jour d'une infection grave.

Incubation de 7 *jours, fièvre de* 7 *jours*, aucun autre symptôme ; sacrifié le 1er jour du retour de la température à la normale, pour des expériences qui n'ont donné aucun résultat.

Au 4e jour de son typhus, ce cobaye a subi une ponction cardiaque pour l'inoculation du bonnet 78 (Voir 5e passage).

Cobaye 79, inoculé en même temps que le cobaye 78, avec une dose égale du même virus. *Incubation* 16 *jours*, *fièvre de* 7 *jours* de durée, pas d'hypothermie consécutive.

Le sang de ce cobaye, prélevé le 11e jour après l'inoculation, 6 jours avant le début de la fièvre, n'a pas infecté le bonnet 79 (inoculation de 5 cent. cubes dans la cavité péritonéale).

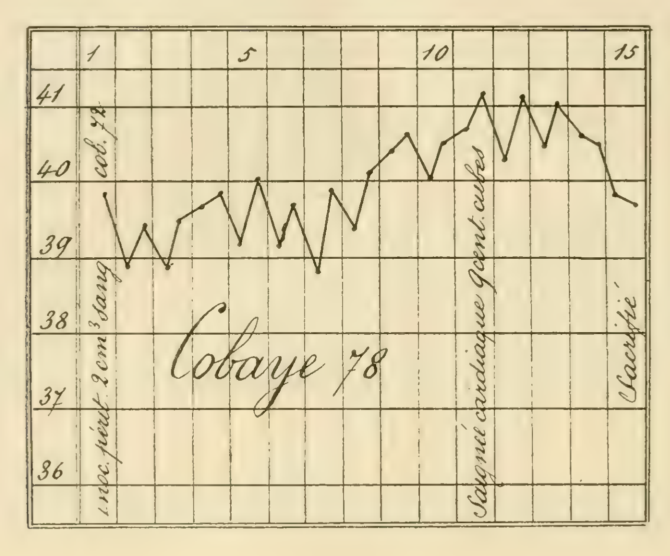
Témoin : *Bonnet* 76. Inoculation pratiquée dans les mêmes conditions que celles des cobayes 78 et 79 à la dose de 4 cent. cubes de sang.

Incubation de 5 jours, typhus grave terminé accidentellement par la mort, au 6e jour de la fièvre, à la suite d'une ponction cardiaque.

Le sang de ce singe s'est montré virulent pour le cobaye 91, non pour le cobaye 90 (Voir plus bas, 6e passage).

LIGNE ISSUE DU COBAYE 75.

Ce cobaye, inoculé avec le sang du bonnet 70, en même temps que le cobaye 72, n'avait, au contraire de ce dernier, présenté aucune élévation thermique. Son sang s'est montré cependant légèrement virulent pour le bonnet 77, et non (de façon apparente du moins) pour les cobayes 81 et 89.



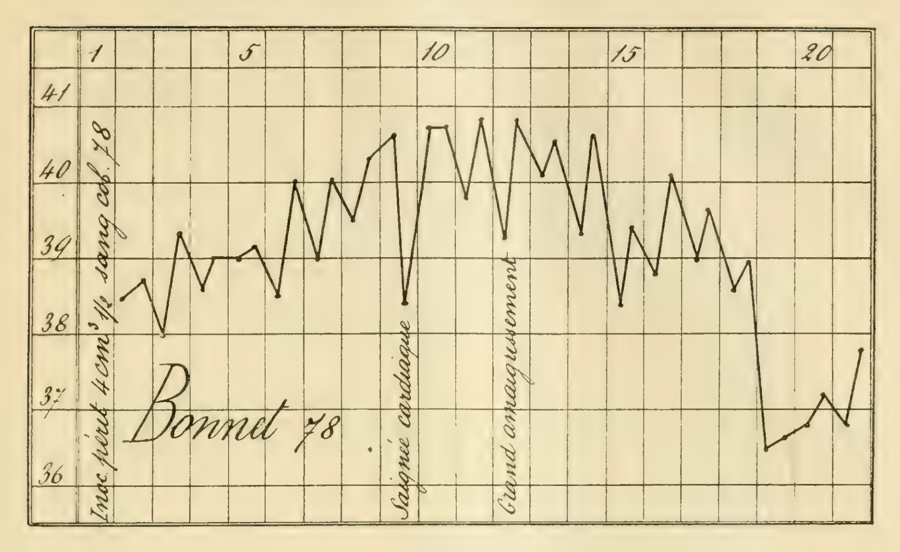
COURBE 5.

Bonnet 77, inoculé, le 20 avril, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 75, prélevé au 14e jour après l'inoculation. *Incubation 7 jours, typhus léger de 2 jours* de durée comparable aux infections bénignes notées chez certains singes dans notre mémoire de l'an passé.

Cobayes 81 et 89, inoculés dans les mêmes conditions que le bonnet 77, avec 2 cent. cubes et 3 cent. cubes 1/2 du même sang. *Aucune réaction consécutive* : nous jugeons inutile de reproduire ici leur courbe thermométrique absolument normale.

PASSAGE V. — LIGNE ISSUE DU COBAYE 78.

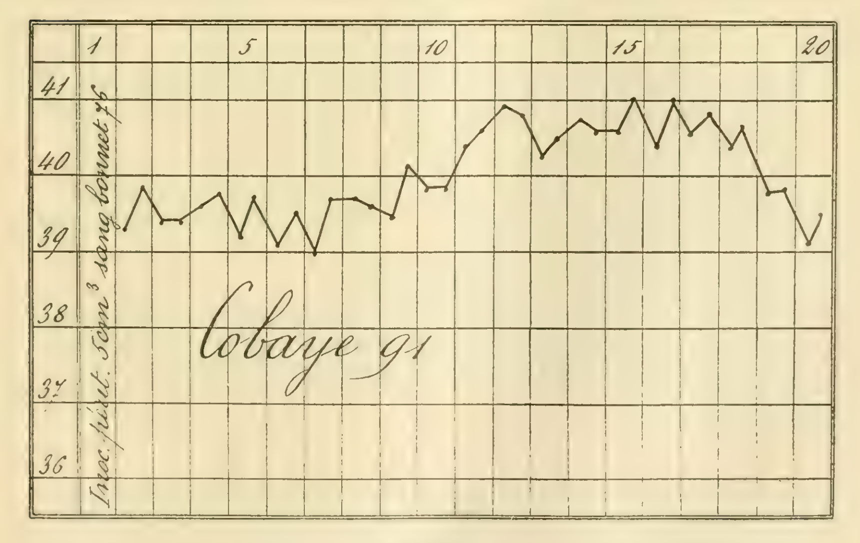
Bonnet 78 (Courbe 6). Ce singe reçoit, le 3? avril, 4 cent. cubes 1/2 de sang du cobaye 78, au 4e jour de son infection. *Incubation 5 jours, typhus très grave d'une durée de 12 jours*, suivi d'hypothermie et d'un amaigrissement considérable. Le sang du bonnet 78 a servi à l'inoculation du cobaye 100 (Voir plus bas).



COURBE 6.

LIGNE ISSUE DU BONNET 76.

Cobayes 90 *et* 91 (Courbe 7). De ces deux animaux, inoculés le 30 avril, avec une quantité égale (5 cent. cubes) de sang du bonnet 76, prélevé au 6e jour de son typhus, l'un, *le* 90, *n'a pas réagi* ; l'autre, *le* 91, *a présenté une fièvre de* 10 *jours* de durée, après une *incubation de* 8 *jours*.

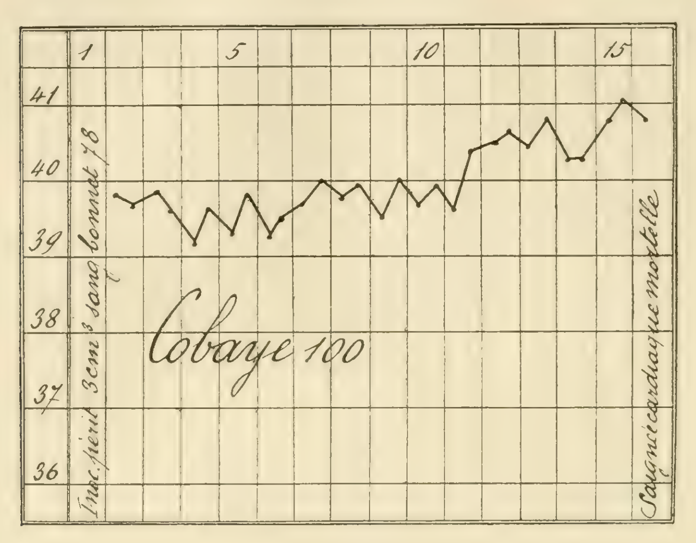


COURBE 7.

PASSAGE VI

Cobaye 100 (Courbe 8), inoculé le 10 mai, avec 3 cent. cubes de sang du bonnet 78, au 6e jour d'un typhus grave. *Incubation* 10 *jours*, *typhus* interrompu le 6e jour par une saignée cardiaque mortelle de 16 cent. cubes.

Le sang de ce cobaye a servi à inoculer le bonnet 88 et les cobayes 77 et 88.



Courbe 8.

PASSAGE VII

Bonnet 88 (Courbe 9). Ce singe reçoit, le 25 mai, 7 cent. cubes de sang du cobaye 100, au 6e jour de son infection. *Incubation* 4 *jours*, *typhus grave de* 11 *jours* de durée, suivi d'une hypothermie légère.

Le sang de ce singe, prélevé au 9e jour de son infection, a servi à inoculer les cobayes 36 et 37, qui n'ont pas réagi, ainsi que plusieurs bonnets chinois neufs ou vaccinés, desquels nous ne retiendrons ici que le bonnet 68, qui a permis la continuation des passages.

Cobaye 77, inoculé, le même jour que le bonnet 88, avec 5 cent. cubes du même sang. *Incubation* 11 *jours*, *typhus net de* 7 *jours*.

Le sang de ce cobaye, prélevé au 7e et dernier jour de son infection, a été inoculé sans résultat au cobaye 17 et avec un résultat douteux au cobaye 71.

Cobaye 88, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 77, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 100. *Incubation* 8 *jours*, *fièvre légère de* 11 *jours de durée*.

PASSAGE VIII. — Ligne du bonnet 88.

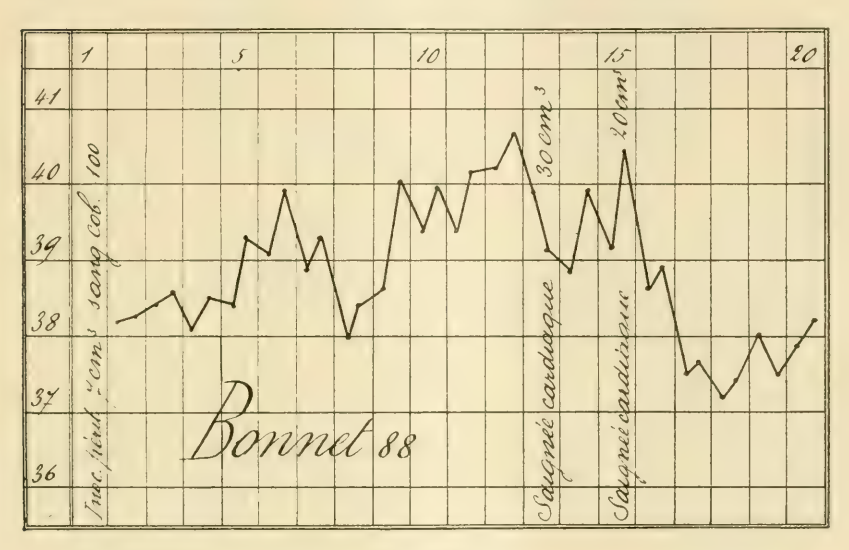
Bonnet 68. Ce singe, non immunisé par une inoculation antérieure et inactive des globules rouges lavés d'un malade atteint de typhus, reçoit, le 6 juin, 5 cent. cubes de sang du cobaye 88, au 9e jour de sa fièvre. *Incuba-*

tion 11 *jours*, *typhus grave de* 8 *jours* de durée. La courbe thermique de ce singe sera donnée au chapitre III de ce mémoire (Courbe 22).

Le sang de ce singe a été utilisé pour l'inoculation des cobayes 52 et 53 (9e passage).

Cobaye 36, inoculé le même jour et dans les mêmes conditions que le bonnet 68, avec 3 cent. cubes du même sang. Ce cobaye n'avait présenté aucune réaction thermique, lorsqu'il est mort des suites d'une ponction cardiaque, au 11e jour après l'inoculation. Un passage, tenté avec son sang 3 cent. cubes) sur le cobaye 92, a donné un résultat négatif.

Cobaye 37, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 36, avec une même dose du même sang. Ce cobaye n'avait présenté aucune réaction thermique, lorsqu'il est mort, des suites d'une ponction cardiaque, au 18e jour après l'inoculation. Des passages, tentés avec son sang (2 cent. 1/2 et 3 cent. cubes). sur les cobayes 20 et 26, ont donné des résultats négatifs.



Courbe 9.

Nous croyons inutile de reproduire ici les courbes des cobayes 36 et 37, absolument normales.

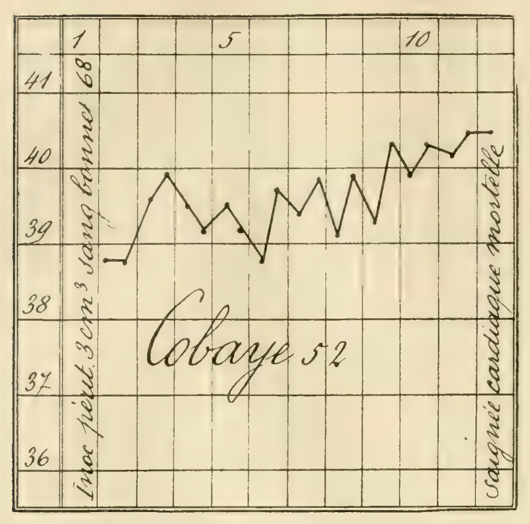
Ligne du cobaye 77.

Cobaye 17. Ce cobaye reçoit, le 11 juin, 3 cent. cubes de sang du cobaye 77, au 7e jour (dernier) de son infection. *Resultat négatif.*

Cobaye 71, inoculé dans les mêmes conditions et avec une même dose de sang que le cobaye 17. *Très faible élévation thermique* du 15e au 18e jour.

PASSAGE IX

Cobaye 52 (courbe 10). Ce cobaye reçoit, le 19 juin, 3 cent. cubes de sang du bonnet chinois 68, au 3e jour de son infection. *Incubation* 8 *jours*, *typhus* interrompu, le 4e jour de la fièvre, par une ponction cardiaque mortelle.



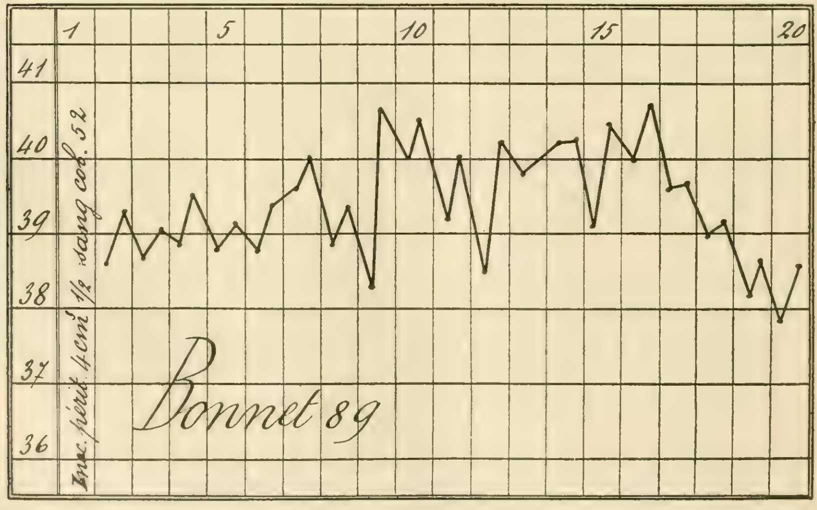
COURBE 10.

Le sang de ce cobaye a été utilisé pour l'inoculation du bonnet 89 et du cobaye 49.

Cobaye 53, inoculé dans les mêmes conditions que le cobaye 52, avec une même dose du même sang. *Incubation* 10 *jours*, *fièvre de* 5 *jours*, terminée par la mort. Autopsie négative.

PASSAGE X

Bonnet 89 (courbe 11). Ce singe reçoit, le 30 juin, 4 cent. cubes 1/2 de sang



COURBE 11.

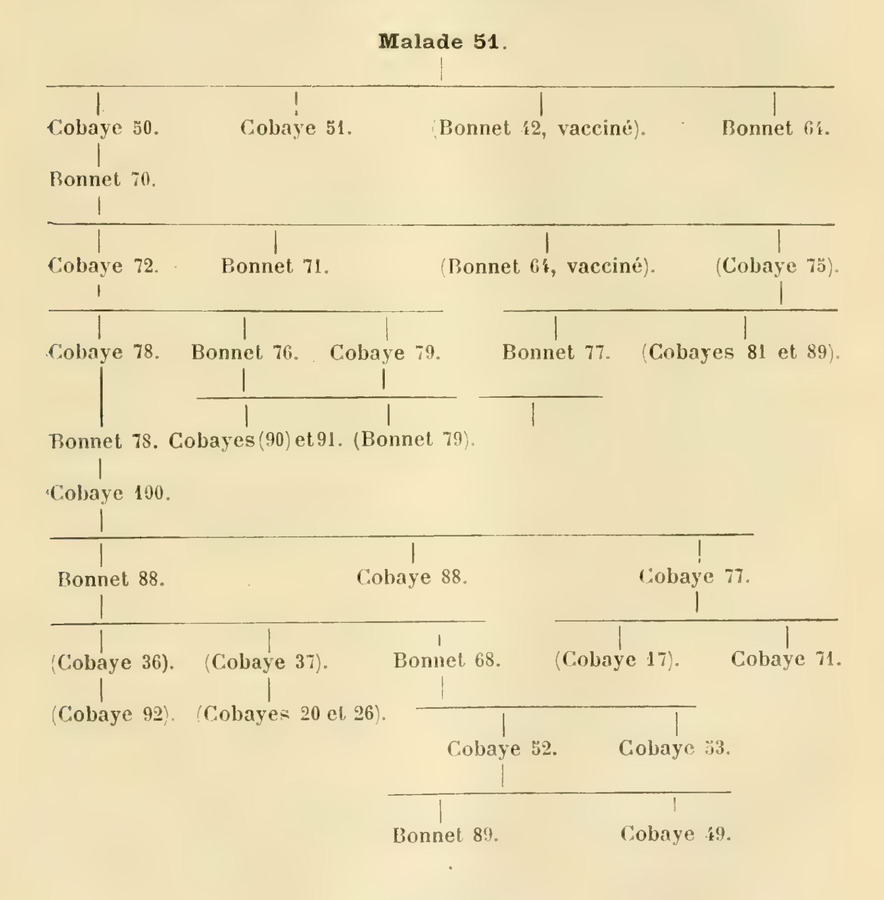
du cobaye 52, au 5e jour de son infection. *Incubation 8 jours, typhus moyen de 9 jours.*

Cobaye 49, inoculé dans les mêmes conditions que le bonnet 89, avec 1 cent. cube 1/2 de sang du cobaye 52. *Résultat douteux* : élévation de température d'un demi-degré du 8e au 10e jour après l'inoculation ; mort le 13e jour, autopsie négative.

Nous n'avons tenté d'inoculations, ni avec le sang du bonnet 89, ni avec celui du cobaye 49 ; notre série de passages par cobayes et singes s'est donc trouvée de ce fait arrêtée.

TABLEAU DES PASSAGES ALTERNATIFS PAR COBAYES ET SINGES

(*Les parenthèses indiquent les animaux qui n'ont pas réagi.*)



II

DONNÉES EXPÉRIMENTALES NOUVELLES SUR LA NATURE ET LE SIÈGE DE L'AGENT PATHOGÈNE DU TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

par Charles NICOLLE, A. CONOR et E. CONSEIL.

Si l'étude expérimentale et l'étiologie du typhus exanthématique ont fait en ces derniers temps d'utiles progrès, notre incertitude est encore grande au sujet de la nature de son agent pathogène. Il est permis d'admettre qu'il s'agit d'un microbe invisible et filtrant; une de nos expériences de l'an passé ne comporte pas d'autre conclusion (Cf. ces *Annales*, 1910, pages 100 et suivantes : Observation du bonnet chinois 47) ; mais la preuve de cette dernière propriété a été particulièrement délicate à établir, en raison du nombre insuffisant des éléments qui traversent le filtre et de la nécessité d'employer de fortes doses de virus pour obtenir à coup sûr l'infection des animaux sensibles.

Une localisation du microbe exanthématique dans l'intérieur de certaines cellules donnerait de cette difficulté une explication des plus claires, la plupart des microbes demeurant prisonniers dans ces cellules. L'un de nous avait émis, dès 1909, l'hypothèse du siège intraleucocytaire du virus. Des expériences nouvelles, dont nous avons donné, dans une note à l'*Académie des Sciences* (séance du 18 septembre 1911, p. 578), un résumé et les conclusions, viennent à l'appui de cette conception.

Des divers éléments du sang, séparés par centrifugation et lavés, les globules blancs sont, en effet, les plus virulents ; une dose minime de ces cellules détermine chez le singe une infection rapide et grave; le plasma, moins actif, semble ne devoir sa virulence qu'aux leucocytes ou débris leucocytaires, dont il est malaisé de le débarrasser complètement ; les globules rouges n'ont pas de virulence. D'autre part, le sérum sanguin centrifugé est inoffensif pour l'être le plus sensible au virus exanthématique, l'homme, et une humeur dépourvue de cellules, le liquide céphalorachidien, se montre également inactive.

A. — Virulence comparée des divers éléments du sang séparés par centrifugation et lavés.

Exp. I. — Le sang utilisé a été prélevé par ponction veineuse sur le malade 120, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 7e jour d'un typhus grave. Aussitôt après sa sortie des vaisseaux, ce sang a été recueilli par fractions de 18 cent. cubes dans des tubes à centrifugation stériles, contenant déjà 2 cent. cubes d'une solution de citrate de soude à 5 p. 100. Sur trois de ces tubes, deux ont été centrifugés pendant douze minutes, le troisième laissé de côté avec son contenu. La centrifugation terminée, nous avons, de suite, prélevé quelques cent. cubes de plasma à la partie supérieure des tubes. D'autre part, la couche leucocytaire a été recueillie avec soin au moyen d'un pinceau, fait de petites languettes de caoutchouc, et additionnée d'eau physiologique à 8 p. 1000 ; quelques centimètres cubes de globules rouges ont été prélevés ensuite à la partie la plus profonde des tubes et additionnés du même liquide. Ces manipulations très minutieuses ont demandé vingt-deux minutes. Après cela, globules blancs et globules rouges en suspension dans l'eau physiologique ont été soumis à une seconde centrifugation de dix minutes de durée. Celle-ci terminée, il nous a fallu six minutes encore pour séparer les cellules du liquide dans lequel on les avait lavées. Il s'est donc écoulé, au total, cinquante minutes entre le prélèvement du sang et les inoculations. Celles-ci ont été pratiquées dans la cavité péritonéale de bonnets chinois, ainsi qu'il suit :

Le *bonnet* 81 a reçu 5 cent. cubes de sang complet citraté (c'est-à-dire en contact avec le citrate de soude aussi longtemps qu'ont duré les manipulations).

Le *bonnet* 82 : 5 cent. cubes de plasma citraté.

Le *bonnet* 83 : 2 cent. cubes et demi de globules rouges centrifugés et lavés.

Le *bonnet* 84 : 1 millimètre cube environ de la couche leucocytaire obtenue par centrifugation et lavée. Examiné à l'ultramicroscope, ce produit montre plus de globules rouges que de globules blancs ; le chiffre de ceux-ci atteint au plus le quart ou le cinquième du total.

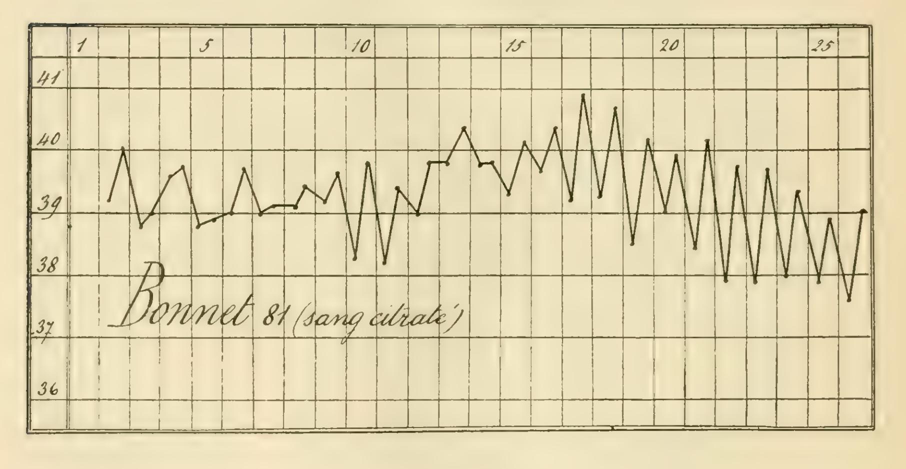
Nous avions pris soin auparavant d'inoculer dès le moment de la récolte du sang, avec une dose uniforme de 4 cent. cubes et demi de ce produit, un *bonnet chinois témoin* (57) et *deux autres bonnets* (62 et 71), *vaccinés* par une atteinte antérieure.

Les résultats de cette expérience ont été les suivants :

Bonnet 57, témoin (sang frais). *Incubation* 16 *jours*, *typhus moyen de* 12 *jours* de durée. La température de ce singe dépasse 40 degrés pendant 6 jours. La longue durée de l'incubation chez ce singe est due à un degré appréciable, quoique insuffisant, de résistance, qu'expliquent ses antécédents. (Cf. à ce sujet l'observation et la courbe de cet animal au Chapitre suivant : Expériences relatives à l'immunité.)

Bonnets 62 et 71, vaccinés (sang frais). *Néant.* (Voir leurs observations au même Chapitre.)

Bonnet 81 (sang citraté). *Incubation* 12 *jours*, *typhus moyen de* 9 *jours*, la température dépasse 40 degrés pendant 7 jours (Courbe 12).

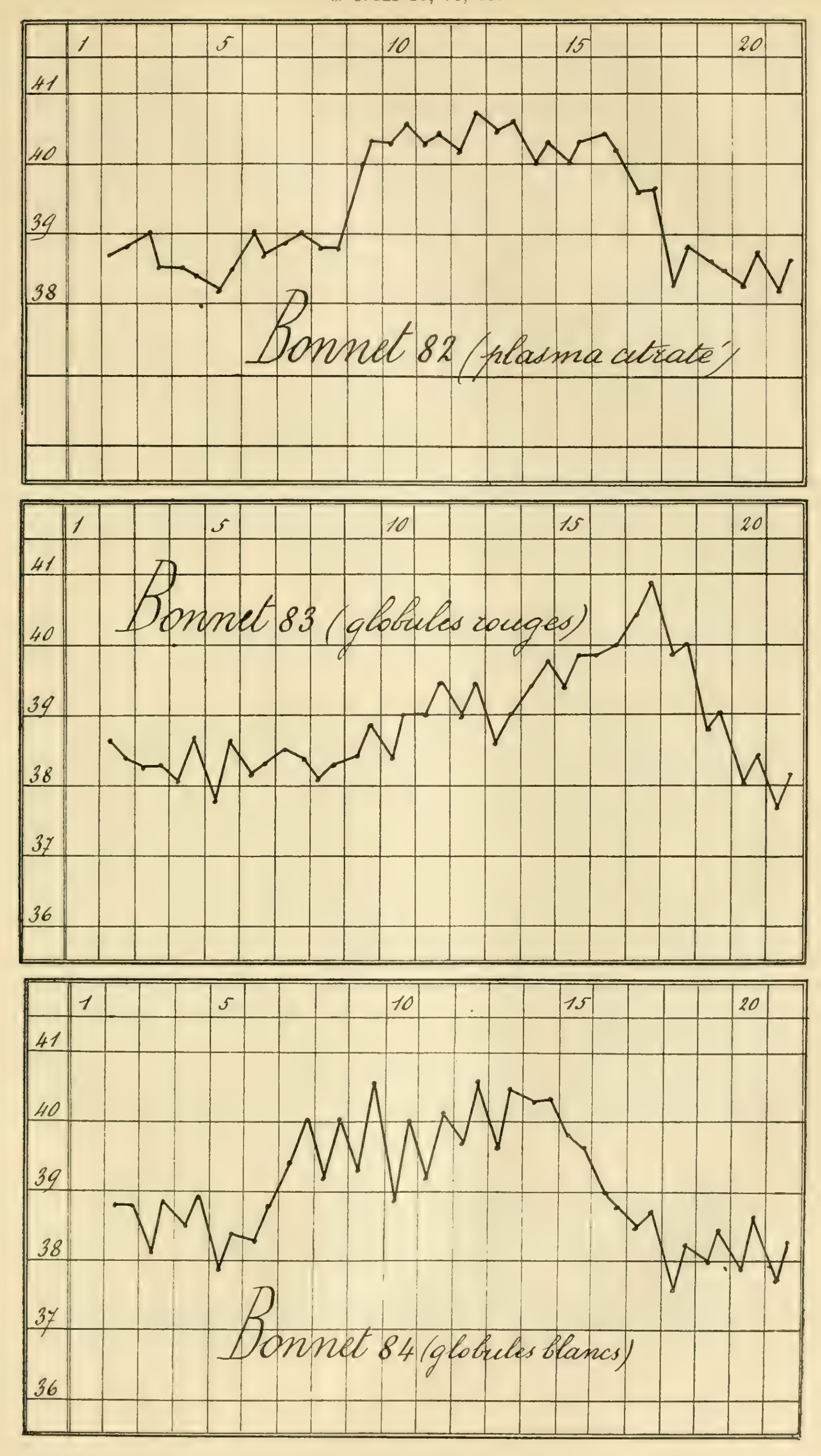


Courbe 12.

Bonnet 82 (plasma citraté). *Incubation* 8 *jours*, *typhus de* 9 *jours* de durée. La température dépasse 40 degrés pendant 6 jours (Courbe 13).

Bonnet 83 (globules rouges). *Incubation* 13 *jours*, *typhus abortif de* 5 *jours*. La température atteint 40 degrés pendant 2 jours et les dépasse une seule fois (Courbe 14).

Bonnet 84 (globules blancs). *Incubation* 6 *jours*, *typhus grave de* 9 *jours*. La température dépasse 40 degrés pendant ces 9 jours (Courbe 15).


1
5
10
15
20
41
40
39
38
Bonnet 82 (plasma citraté)
1
5
10
15
20
41
40
39
38
37
36
Bonnet 83 (globules rouges)
1
5
10
15
20
41
40
39
38
37
36
Bonnet 84 (globules blancs)

Exp. II. — Pratiquée dans les mêmes conditions que la précédente, avec le sang du malade 69, pavillon Emile-Roux, hôpital de la Rabta, au 13[e] jour d'un typhus grave, la veille de la défervescence. La séparation des divers éléments du sang a demandé 30 minutes et a été plus parfaite que dans la première expérience; la couche leucocytaire, en particulier, était manifestement plus abondante et ne contenait qu'une proportion minime de globules rouges.

Trois singes ont été inoculés dans la cavité péritonéale, savoir : le *bonnet* 67, avec 5 cent. cubes de plasma citraté ; le *bonnet* 68, avec 3 cent. cubes de globules rouges, centrifugés et lavés ; le *bonnet* 79, avec 1 millim. cube de globules blancs représentant approximativement le dépôt leucocytaire obtenu par centrifugation de 10 cent. cubes de sang. Il n'a pas été pratiqué d'inoculation de sang complet, citraté ou frais. Les résultats de cette expérience ont été les suivants :

Bonnet 67 (plasma citraté). *Incubation* 13 *jours, typhus léger de* 7 *jours.* La température n'atteint 40 degrés que trois jours (Courbe 16).



Courbe 16.

Bonnet 68 (globules rouges). *Néant.*

Bonnet 69 (globules blancs). *Incubation* 7 *jours, typhus grave de* 11 *jours.* La température dépasse 40 degrés pendant 9 jours (Courbe 17).

Eprouvés, 67 jours après la première inoculation, par l'injection intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, atteint d'un typhus grave au

5e jour de la fièvre, les bonnets 67 et 69 n'ont pas réagi, le 68 (globules rouges) a présenté un typhus grave après 11 jours d'incubation (Voir plus loin leurs courbes au Chapitre : Immunité).



COURBE 17.

CONCLUSIONS. — Des deux séries d'expériences que nous venons de rapporter, il est permis de conclure que les globules blancs représentent dans le sang l'élément le plus virulent, puisqu'une dose infinitésimale de la couche leucocytaire obtenue par centrifugation se montre aussi efficace que la quantité totale du liquide de laquelle elle a été séparée.

Le plasma, moins actif, semble ne devoir sa virulence qu'aux globules blancs et débris leucocytaires, dont il est bien difficile de le séparer entièrement.

Les globules rouges sont dénués de tout pouvoir pathogène. Une dose de ces cellules 2.500 fois supérieure à celle qui est nécessaire pour obtenir l'infection, lorsqu'il s'agit de globules blancs, s'est montrée entièrement inactive.

Pour apprécier exactement ces résultats, il convient cependant de noter que les prélèvements de sang n'ont pas été pratiqués à la même période de la maladie humaine dans nos deux expériences : 7e jour, pour le premier cas; 13e jour, pour le second, et que la quantité de globules blancs obtenue par centrifugation a été incomparablement plus importante chez le

deuxième malade que chez le premier. La plus parfaite localisation du virus dans les globules blancs et la moindre activité du plasma dans le second cas peuvent être en rapport, au moins partiellement, avec une réaction de défense de l'organisme (englobement du virus par les leucocytes), et, de fait, chez ce malade, la défervescence s'est produite le lendemain de l'expérience.

Il semble cependant acquis que, dès la période d'état, le siège principal, sinon unique, de l'agent inconnu du typhus est le globule blanc. Cette opinion, à laquelle les expériences que nous venons de relater apportent un si grand poids, s'accorde avec l'existence constatée par l'un de nous de lésions dégénératives des leucocytes polynucléaires dans le typhus. La localisation du microbe dans ces cellules donnerait la seule explication plausible des résultats presque toujours négatifs de la filtration du sérum. On comprendrait ainsi qu'un microbe invisible et dont les faibles dimensions devraient par là même permettre le passage à travers les bougies Berkefeld, retenu dans des cellules de dimensions plus grandes que les pores du filtre, ne puisse traverser ceux-ci. C'est là, nous l'avons dit, notre opinion. Les expériences qui suivent viennent encore l'appuyer.

B. — Non virulence du sérum sanguin débarrassé de ses éléments cellulaires par centrifugation.

Le sérum sanguin de coagulation est, théoriquement du moins, dépourvu de cellules, celles-ci demeurant emprisonnées dans le caillot au moment de sa rétraction ; il doit donc être, dans le typhus, si notre hypothèse du siège intraleucocytaire du microbe est exacte, dépourvu généralement de virulence et, de fait, dans nos expériences de l'an passé, sur trois singes inoculés avec des doses suffisantes de sérum provenant de singes ou homme infectés, un seul a contracté la maladie ; chez les deux autres, on n'a constaté ni infection, ni immunité (Cf. notre mémoire de 1910 de ces *Annales*, p. 102). L'expérience qui a donné un résultat positif était un passage de bonnet chinois à bonnet chinois ; celles qui sont demeurées négatives avaient

été pratiquées sur le bonnet chinois avec un sang humain dans un cas et de chimpanzé dans l'autre.

On se souvient que, par contre, le sérum obtenu par centrifugation de sang défibriné a donné, dans les deux expériences de Ricketts et Wilder, des résultats positifs (infection et immunité des singes inoculés).

Nous avons fourni, dans notre mémoire antérieur, une explication de ces faits; elle est des plus claires, si l'on admet le siège intraleucocytaire du virus. Les manœuvres de défibrination, en déchirant les globules blancs, amènent la sortie d'un grand nombre de microbes; ceux-ci, mis en liberté dans le liquide, lui communiquent un pouvoir pathogène dont le sérum de coagulation est généralement dépourvu. Ce sérum ne doit présenter en effet de virulence que s'il n'est qu'incomplètement privé de globules blancs; et c'est là ce qui était arrivé sans doute dans notre expérience positive de l'an passé.

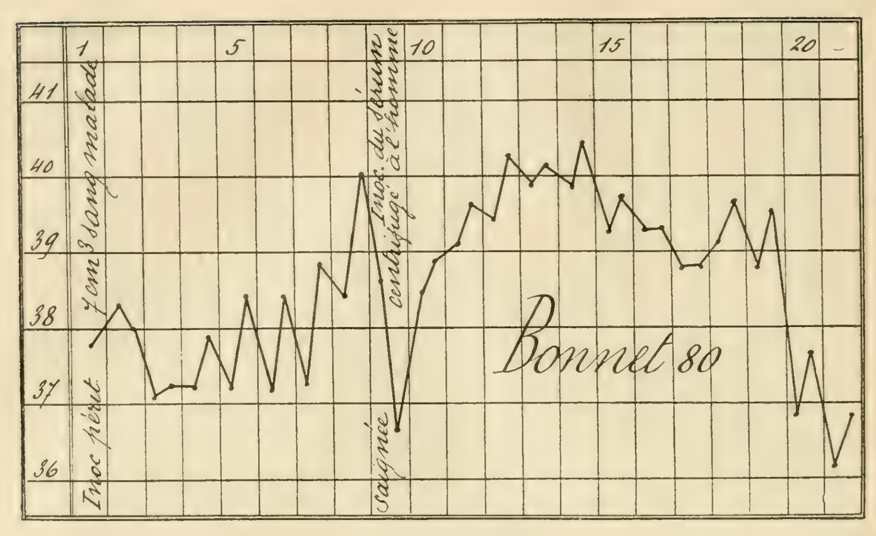
On pouvait nous objecter cependant que la non réussite habituelle de ces inoculations était due à ce que le singe n'offre à l'infection exanthématique qu'une sensibilité en somme relative (il faut pour infecter à coup sûr un bonnet chinois 3 à 4 cent. cubes de sang et la voie péritonéale), suffisante pour une étude expérimentale, mais non comparable à celle de l'être normalement atteint, l'homme.

Désirant trancher de façon définitive la question et persuadés d'avance que nous obtiendrions un résultat négatif, nous n'avons pas hésité à expérimenter sur l'un de nous (N.).

Le sérum utilisé dans cette expérience nous a été fourni par le bonnet 80, inoculé dans la cavité péritonéale, le 21 avril, avec 7 cent. cubes de sang du malade 88, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10e jour d'un typhus grave.

Cette inoculation a été suivie, après 6 jours d'incubation, du développement d'une infection très sérieuse, d'une durée de 13 jours, puis d'hypothermie et d'amaigrissement notable (Courbe 18).

Au 3e jour, nous prélevons sur ce singe, par ponction cardiaque, quelques centimètres cubes de sang que nous plaçons dans une pièce fraîche et, sept heures plus tard, lorsque le sérum est bien séparé du caillot, nous prélevons ce liquide et nous le centrifugeons pendant 10 minutes; après quoi, un centimètre cube en est injecté dans la veine du bras de l'un de nous, indemne de toute atteinte antérieure de typhus. Aucun symptôme fébrile ou autre n'a suivi cette inoculation.



Courbe 18.

Le résultat négatif de cette expérience ne peut être attribué à des propriétés bactéricides dont jouirait *in vitro* le sérum sanguin sur l'agent pathogène du typhus; l'observation du bonnet 35 de notre mémoire de l'an passé démontre qu'il n'en est rien. Ce singe, en effet, a pu être infecté par l'inoculation intrapéritonéale de 15 cent. cubes du sérum du bonnet 19, neuf heures après la récolte du sang (Cf. notre mémoire précédent, p. 108).

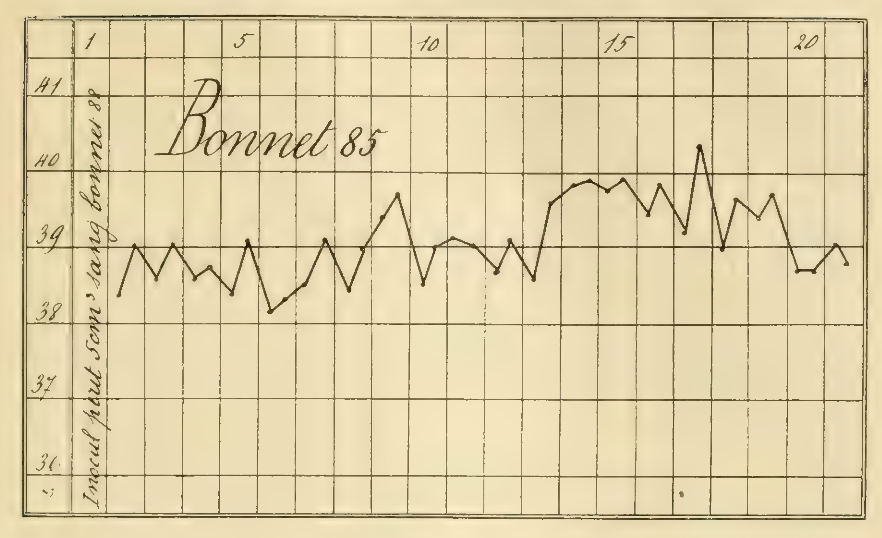
Le sérum sanguin de coagulation est donc, en l'absence de toute cellule, entièrement dépourvu de pouvoir pathogène.

C. — Non virulence du liquide céphalorachidien.

Ce liquide, qui ne contient aucun élément cellulaire, offre une virulence nulle; l'expérience suivante le démontre :

Le *bonnet chinois* 85 reçoit, le 23 avril, dans la cavité péritonéale, 15 cent. cubes du liquide céphalorachidien du malade 93, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 9e jour d'un typhus exanthématique grave. *Résultat négatif* (la température a été prise pendant 40 jours).

Eprouvé 44 jours plus tard, par l'inoculation intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9e jour d'un typhus expérimental classique, le bonnet 85 a fait une infection des plus nettes, d'une semaine de durée, après une incubation de 12 jours (Courbe 19).



COURBE 19.

D. — EXPÉRIENCE NÉGATIVE DE FILTRATION DU VIRUS EXANTHÉMATIQUE AVEC DES PRODUITS LEUCOCYTAIRES.

Les leucocytes se montrant hautement virulents, nous espérions qu'il serait peut-être possible d'obtenir, par la désagrégation artificielle d'une quantité importante de ces cellules, assez de microbes libres pour que leur émulsion filtrée infecte ou immunise le singe. Il n'en a rien été; dans ce cas encore, le nombre des microbes qui ont traversé le filtre était sans doute insuffisant.

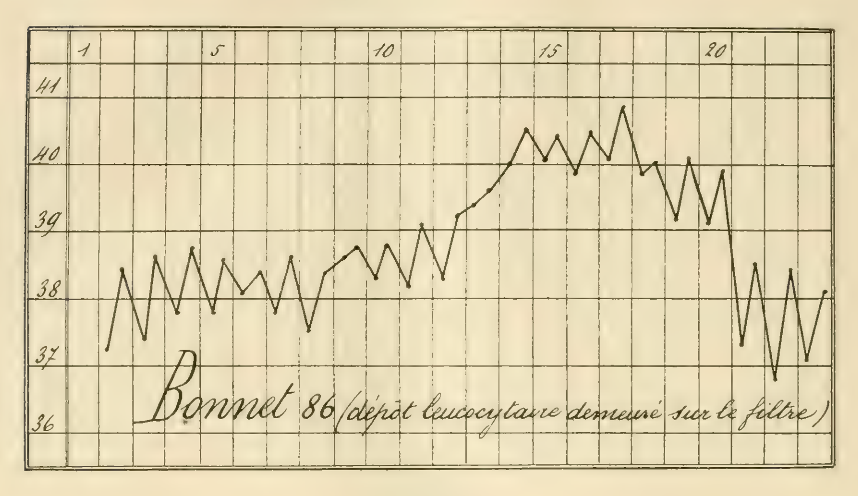
La couche leucocytaire, obtenue par centrifugation de 70 cent. cubes de sang citraté du malade 120, au 7ᵉ jour d'un typhus grave (Voir l'expérience I de centrifugation citée plus haut), a été soumise successivement à un broyage, puis à un laquage par l'eau distillée d'une durée de vingt minutes, enfin additionnée d'eau physiologique, et filtrée sur bougie Berkefeld du modèle le plus perméable. Ces diverses opérations ont demandé une heure et demie environ.

Le *bonnet chinois* 86 a reçu dans la cavité péritonéale la meilleure partie du dépôt demeuré sur le filtre; le 87 de la même manière, la totalité du produit filtré. Les résultats ont été les suivants :

Bonnet 86 (dépôt demeuré sur le filtre). *Incubation* 10 *jours*, *typhus classique de* 10 *jours*, suivi d'hypothermie (Courbe 20). Ce résultat est à ajouter à ceux des expériences I et II; il contribue à établir la haute virulence des leuco-

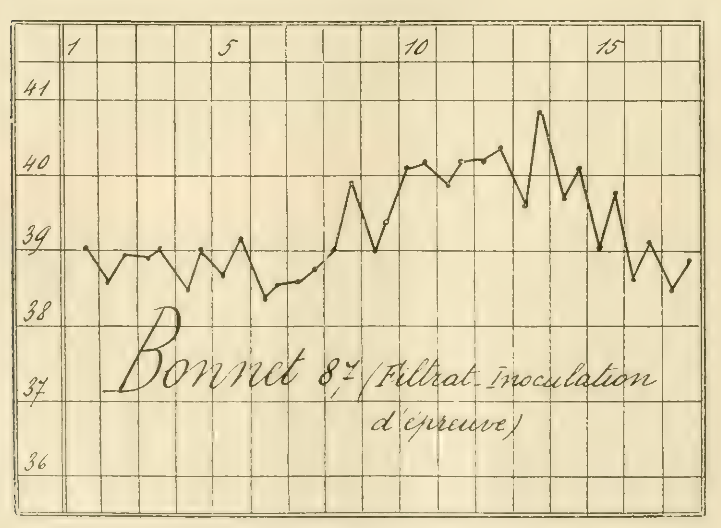
18

cytes et il prouve la résistance du virus au traitement par l'eau distillée et à des manipulations assez longues.



COURBE 20.

Bonnet 87 (filtrat). *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours) Eprouvé, 48 jours après l'inoculation, par l'injection intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang du malade 162, hôpital de la Rabta, pavillon Laveran, au 9e jour d'un typhus mortel, ce singe a contracté un typhus de 8 jours de durée, après une incubation de 7 jours (Courbe 21).



COURBE 21

L'extrait leucocytaire filtré s'est donc montré dépourvu de propriétés pathogènes ou vaccinantes.

L'expérience positive de filtration du virus exanthématique relatée dans notre précédent mémoire demeure par conséquent unique.

Que les globules blancs du sang constituent ou non le siège exclusif du virus exanthématique, la propriété qu'ils offrent de présenter, sous un volume restreint et facilement maniable, un produit hautement virulent est intéressante à signaler. Elle trouvera utilement son application dans les expériences où l'emploi de doses fortes et par là même toxiques de sang complet semblaient jusqu'à présent nécessaires.

III

EXPÉRIENCES CONCERNANT L'IMMUNITÉ

par CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL

Nos expériences de l'an passé nous avaient conduits à cette conclusion qu'une première atteinte de typhus expérimental donnait au singe une immunité solide toutes les fois que la maladie avait été grave et quel que fût le mode d'infection (sang, poux), et qu'au contraire une atteinte légère et abortive (par sang virulent employé à doses trop faibles ou par voie cutanée, sérum sanguin ou sang chauffé) n'était généralement pas suivie d'immunisation; ce qui revenait à dire que, seule, une atteinte sévère de typhus préservait à coup sûr contre une infection nouvelle.

Nos recherches de 1911 nous ont permis de confirmer exactement cette conclusion; les expériences très diverses que nous allons brièvement rapporter en sont la preuve; elles s'accordent également à démontrer que l'*immunité par virus actif s'établit vite et qu'elle dure au moins une année.*

A. — Une inoculation de virus actif donne une immunité rapide et durable.

1° Immunisation par inoculation de sang complet.

Bonnet 42. 1re inoculation (1), le 14 août 1910, de 4 cent. cubes 1/2 de sang du bonnet 20, au 7e jour d'un typhus grave, la veille de la défervescence. Incubation 12 jours, typhus grave de 11 jours, hypothermie, amaigrissement, guérison (Voir dans notre mémoire précédent, p. 25, l'observation et la courbe thermique de ce singe).

Inoculation d'épreuve, le 17 mars 1911, avec 5 cent. cubes de sang du malade 51, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 11e jour d'un typhus grave. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Trois témoins neufs, le *bonnet* 64 et les *cobayes* 50 et 51, ont présenté un typhus grave (voir plus haut chapitre 1 de ce mémoire).

Bonnet 64. 1re inoculation, le 17 mars 1911, avec 4 cent. cubes de sang du malade 51. Incubation 6 jours, typhus classique d'une durée de 10 jours.

Inoculation d'épreuve, le 7 avril, soit 5 jours après guérison de la première infection, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 70, au 4e jour de sa maladie. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, le *bonnet* 71 et les *cobayes* 72 et 75, qui ont contracté le typhus (voir plus haut, chapitre 1 de ce mémoire).

Bonnet 71. 1re inoculation, le 7 avril 1911, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 70, au 4e jour de son infection. Incubation 8 jours, typhus grave de 12 jours de durée.

Inoculation d'épreuve, le 21 mai, soit 24 jours après guérison de la première infection, avec 5 cent. cubes de sang du malade 120, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 6e jour de sa maladie. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, les *bonnets* 81, 82, 84 qui ont contracté le typhus (voir plus haut, chapitre II, première expérience).

2° Immunisation par inoculation de plasma virulent.

Bonnet 67. 1re inoculation, le 29 mars 1911, avec 5 cent. cubes de plasma citraté du malade 69, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 13e jour de sa maladie. Incubation 13 jours, typhus relativement bénin de 7 jours (voir plus haut, courbe 16).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 48 jours après guérison de la première atteinte, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9e jour de son infection. *Résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoins, les *bonnets* 66, 77 et 85, qui ont contracté le typhus (voir plus bas dans ce même chapitre leurs observations et leurs courbes).

(1) Les inoculations virulentes et les inoculations d'épreuve ont toujours été pratiquées dans la cavité péritonéale.

B. — Une inoculation inefficace ou insuffisamment active ne donne pas d'immunité.

1° Non immunisation a la suite d'une infection abortive par inoculation de sang.

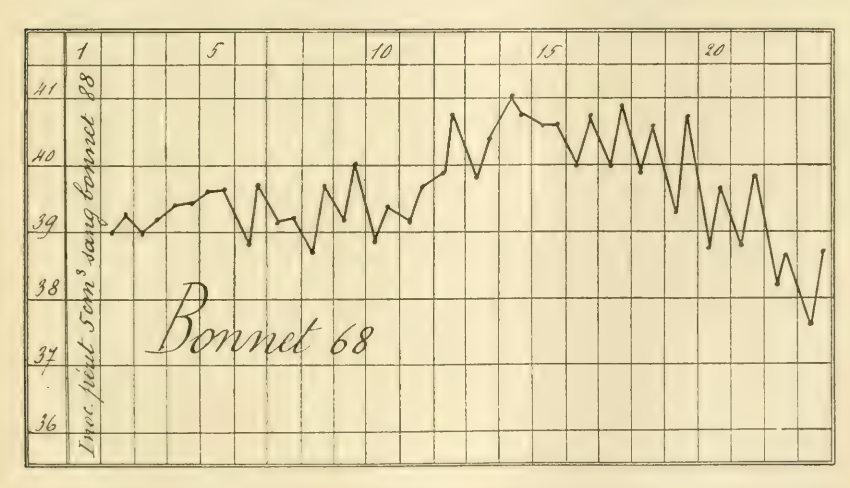
Bonnet 77. 1re inoculation, le 20 avril 1911, avec 4 cent. cubes de sang du cobaye 75, au 14e jour après sa propre inoculation, en dehors de toute réaction thermique. (Cf., chapitre 1, l'observation particulièrement intéressante de ce cobaye.) Incubation 7 jours, typhus abortif de 2 jours de durée.

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 38 jours après guérison de la première atteinte, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9e jour de son infection. *Incubation 11 jours, typhus de gravité moyenne de 11 jours de durée.* Les témoins, bonnets 68 et 85, ayant reçu antérieurement des produits non virulents (globules rouges et liquide céphalorachidien), ont pris le typhus après une incubation d'une durée identique (voir plus bas).

2° Non immunisation par inoculation inefficace de globules rouges.

Bonnet 68. 1re inoculation, le 29 mars 1911, avec 2 cent. cubes 1/2 des globules rouges centrifugés et lavés du malade 69 (voir chapitre précédent, deuxième expérience), résultat négatif (température prise pendant 40 jours).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, soit 79 jours après la première inoculation, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88, au 9e jour de son infection. *Incubation* 11 *jours, typhus grave de* 8 *jours* (courbe 22). Le virus du bonnet 68 a infecté les cobayes 52 et 53, et, par l'intermédiaire du premier, le bonnet 89.



Courbe 22.

3° Non immunisation par inoculation inefficace de liquide céphalorachidien.

Bonnet 85. 1re inoculation, le 23 avril 1911, avec 15 cent. cubes de liquide céphalorachidien du malade 93, au 9e jour d'un typhus grave (voir chapitre précédent). Résultat négatif (température prise pendant 40 jours).

Inoculation d'épreuve, le 6 juin, avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 88. au 9e jour d'un typhus grave. *Incubation 12 jours, typhus d'une durée de 7 jours* (voir plus haut, courbe 19).

C. — Effets des inoculations simultanées ou successives de sang virulent et de sérum préventif (*Sérovaccination*).

Il nous a paru intéressant de rechercher comment se comporteraient, vis-à-vis d'une inoculation d'épreuve, les animaux soumis antérieurement et à la fois à des inoculations de sang virulent et de sérum de malades convalescents de typhus, soit que ce sérum ait été employé préventivement, c'est-à-dire avant l'inoculation du virus, soit qu'il en ait été fait usage plus tard, pour le traitement de l'infection expérimentale déclarée.

Nos expériences de l'an passé nous avaient montré qu'un tel sérum, s'il est doué de propriétés préventives manifestes lorsqu'on le recueille dans les premiers jours qui suivent la chute de la température, n'offre plus qu'un pouvoir vaccinant incertain quand il est recueilli plus tard et que, dans tous les cas, ses propriétés curatives sont des plus faibles (L'application de ce sérum au traitement de l'homme malade ne donne aucun bénéfice appréciable. Des expériences nouvelles nous l'ont prouvé; nous les rapportons plus loin).

Sur ceux de nos singes qui survivaient de nos expériences de l'an passé, nous en comptions quatre ayant reçu des injections de sérum de convalescents, deux au cours de leur infection déclarée, et deux préventivement. Des deux derniers, l'un avait été protégé effectivement par un sérum recueilli dans les premiers jours de la convalescence et suffisamment actif, l'autre n'avait tiré d'autre bénéfice de l'injection d'un sérum plus ancien qu'un léger allongement de la période d'incubation de son typhus.

Ces singes, soumis en 1911 à une inoculation d'épreuve, ont fourni les résultats auxquels on pouvait s'attendre : les trois qui avaient présenté une infection nette en 1910 n'ont pas réagi; celui que le sérum avait alors protégé a montré, sauf une durée plus longue de la période d'incubation (16 jours au lieu de 6, 8 et 10), la même sensibilité que les témoins neufs.

La loi que nous avons formulée au début de ce chapitre trouve, dans ces résultats, une nouvelle confirmation; seule, une atteinte sévère de typhus préserve à coup sûr contre une infection nouvelle.

Voici les observations de nos quatre singes.

1° Singes ayant présenté antérieurement un typhus expérimental traité par le sérum.

Ils avaient acquis l'immunité.

Bonnet 56. — Ce singe, inoculé le 5 juillet 1910, dans la cavité péritonéale (Cf. notre précédent mémoire, courbe 47, p. 52), avec 5 cent. cubes de sang du bonnet 44, a présenté, après 7 jours d'incubation, un typhus grave. Il était en pleine infection, lorsqu'il a reçu, les 9e et 10e jours de sa fièvre, en injections sous-cutanées, 2 inoculations de 2 cent. cubes d'un mélange du sérum des malades 50 et 51 recueilli les 11e et 9e jours après la guérison de leur typhus. Ce mélange était doué de propriétés préventives manifestes (voir plus bas l'observation du bonnet 57). Sous l'influence de ce traitement, la température du bonnet 56 est tombée en 48 heures à la normale et l'état général s'est vite amélioré. Cependant, malgré cette action bienfaisante, la fièvre a eu, au total, une durée de 12 jours.

L'inoculation d'épreuve, pratiquée le 18 juin 1911, avec 4 c. c. 1/2 de sang du malade 146, hôpital de la Rabta (pavillon Murchison), atteint d'un typhus grave à une période imprécise de son infection, la veille de la mort, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours).

Bonnet 62. — Ce singe, inoculé le 10 août 1910 dans la cavité péritonéale, avec 5 cent. cubes de sang du magot 7, au 6e jour d'un typhus sévère, s'infecte, après 7 jours d'incubation. Il présente un typhus grave, lorsque, le 5e jour de sa fièvre, on lui inocule sous la peau 2 cent. cubes d'un mélange du sérum des malades 37, 54 et 56, guéris depuis 14, 20 et 27 jours; ce mélange s'était montré doué de propriétés préventives très faibles. Son inoculation au bonnet 62 amène une baisse immédiate de la température qui remonte après 24 heures; on lui fait alors une deuxième inoculation du même sérum à même dose, nouvelle baisse de 24 heures, puis réascension et la fièvre dure encore 4 jours. L'influence du sérum, dans ce cas, a été manifeste et la guérison s'est faite sans hypothermie, mais après une durée totale de 13 jours (Cf. dans notre mémoire précédent l'observation et la courbe de ce singe, p. 53).

L'inoculation d'épreuve, pratiquée le 18 juin 1911, avec 4 c.c. 1/2 de sang du malade 146, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours).

2° Singe traité inefficacement par une injection préventive d'un sérum insuffisamment actif.

Il avait acquis l'immunité.

Bonnet 61. — Ce singe, inoculé le 10 août 1910, dans la cavité péritonéale, avec 5 cent. cubes de sang du magot 7, au 6e jour d'un typhus grave et en

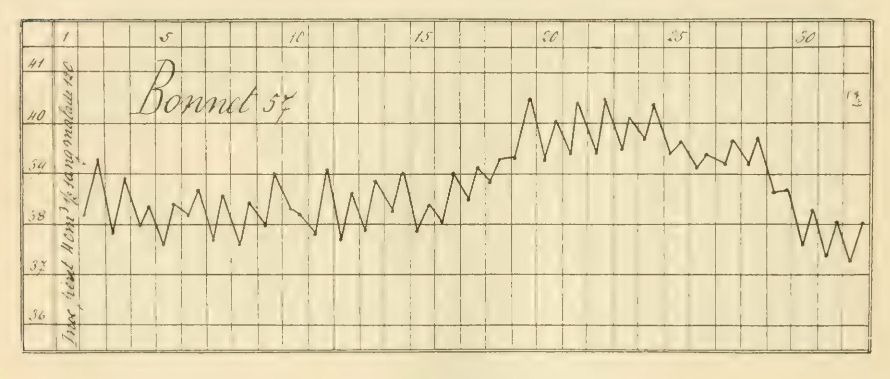
même temps sous la peau avec une quantité égale d'un mélange de sérum des malades 37, 54 et 56, guéris depuis 14, 20 et 27 jours, a contracté quand même un typhus grave d'une durée de 7 jours, après 5 jours d'incubation (Cf. l'observation et la courbe de ce singe dans notre mémoire précédent, page 50).

L'inoculation d'épreuve pratiquée le 24 mars 1911, avec le sang du malade 62, hôpital de la Rabta, pavillon Emile-Roux, au 15e jour de sa maladie, a donné un *résultat négatif* (température prise pendant 40 jours). Témoin le bonnet 65 qui s'est infecté.

3o Singe protégé efficacement par une injection de sérum préventif.

Il n'avait pas acquis l'immunité.

Bonnet 57. — Ce singe avait reçu, le 14 juillet 1910 à midi, une inoculation sous-cutanée de 4 c. c. 1/2 de mélange du sérum des malades 50 et 51, aux 11e et 9e jours de la convalescence de leur typhus, et, le même jour, à 6 heures du soir, dans la cavité péritonéale, 4 cent. cubes de sang du malade 37, atteint d'un typhus grave au 10-12e jour; témoins : le bonnet 20 et le magot 5, qui se sont infectés. Le bonnet 57 n'avait présenté aucune réaction (température prise pendant 40 jours).



Courbe 23.

L'inoculation d'épreuve a été pratiquée le 21 mai 1911, avec 4 centimètres de sang du malade 120, utilisé dans plusieurs expériences relatées plus haut. Le bonnet 57 a contracté un *typhus grave de* 12 *jours* de durée, suivi d'hypothermie, après 16 *jours d'incubation* (courbe 23). Cette longueur anormale de l'incubation est le seul bénéfice que ce singe semble avoir tiré de l'inoculation ineffective de sang virulent, pratiquée dix mois auparavant.

(*A suivre.*)

LE « MAL DE LURE »

PYOHÉMIE SECONDAIRE A L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

(avec la pl. IV)

par H. CARRÉ

Chef du Laboratoire des recherches sur les Maladies infectieuses

(École d'Alfort).

Au cours des recherches systématiques que je poursuis depuis plusieurs années sur la suppuration chez le mouton, j'avais isolé, en novembre 1910, dans le pus d'une mammite phlegmoneuse de la brebis, mammite cliniquement semblable à celle due au microbe de la suppuration caséeuse (V. *Revue générale de Médecine Vétérinaire*, 1er décembre 1910), un petit bacille très délicat existant en abondance dans les lésions.

La brebis provenait d'un lot de bêtes en très mauvais état, achetées au marché de la Villette et d'origine inconnue.

J'avais conservé les cultures de ce bacille, mais, ne lui accordant qu'un intérêt relatif, j'en avais ajourné l'étude approfondie, quand de récentes constatations m'ont fait voir qu'il pouvait revendiquer une place assez importante dans la pathologie ovine et caprine.

En janvier 1911, M. le vétérinaire en 1er Lardeyret m'écrivait : « Une maladie épidémique extrêmement grave a sévi sur un grand nombre de troupeaux au pâturage, cet été, dans la montagne de Lure (confins de la Drôme et des Basses-Alpes).

La maladie se manifestait par la fonte purulente des yeux et par la présence d'arthrites suppurées des genoux, des grassets et des hanches, avec étisie musculaire progressive suivie d'épuisement organique.

Elle atteignait plus spécialement les antenais, mais les brebis de quatre à cinq ans n'en étaient pas exemptes. Bien que la mortalité ne fût pas très élevée, les pertes étaient néanmoins considérables pour les éleveurs, car les animaux atteints restaient aveugles, émaciés, boiteux et peu susceptibles d'engraissement après guérison.

Les lésions consistaient en étisie complète, sans lésions viscérales apparentes, sauf toutefois de légers foyers de bronchopneumonie : fonte purulente du globe oculaire avec sanie intraorbitaire, abcès articulaires avec pus verdâtre, ramollissement



N° 511. — Maladie naturelle.

des ligaments articulaires qui prenaient un aspect gélatiniforme, lésions d'arthrites suppurées.

C'est la première fois qu'une pareille infection est observée dans le pays et l'ennui des éleveurs est d'autant plus grand que les pertes par maladies contagieuses sont, chaque année, de plus en plus nombreuses. »



N° 455. — Maladie expérimentale.

Avec ces renseignements précis, M. Lardeyret me faisait expédier par M. Jeoffroy, de Forcalquier, deux sujets atteints de la maladie; je suis très heureux de renouveler ici, à ces messieurs, mes plus vifs remerciements.

Des deux moutons envoyés de Forcalquier, dans un état de maigreur extrême, un seul présentait des lésions oculaires (n° 420).

L'examen clinique et celui des lésions révélées par l'autopsie répondaient intégralement à la description faite par M. Lardeyret.

L'examen microscopique du pus de la chambre antérieure du mouton 420 fit voir, en abondance, un bacille très grêle, prenant le Gram, refusant de pousser sur les milieux simples, bacille que j'identifiai facilement avec celui que j'avais isolé en novembre 1910 d'une mammite phlegmoneuse.

L'inoculation de ce microbe au mouton me fournit des résultats tels qu'une étude de la maladie sur place me parut indiquée.

M. Arlaud, vétérinaire départemental des Basses-Alpes, et M. Jeoffroy, de Forcalquier, se mirent avec le plus grand empressement à ma disposition pour me faire visiter les centres infectés, environs d'Oraison et montagne de Lure, tandis que mon excellent ami Pleindoux, vétérinaire départemental de la Vaucluse, m'accompagnait à l'autre extrémité de cette région montagneuse, vers Orange, dans les contreforts ouest du mont Ventoux.

Grâce à ces concours empressés, j'ai pu voir nombre de cas cliniques et retrouver, notamment, en plus des lésions oculaires et articulaires, les lésions de la mamelle.

Tandis qu'à l'est, vers Forcalquier et Oraison, la mortalité était en somme exceptionnelle, à l'ouest, au contraire (Gigondas), nous avons rencontré en pleine montagne un troupeau déjà visité antérieurement à mon arrivée par M. Pleindoux et dont il a bien voulu nous communiquer l'histoire.

Je la transcris intégralement ici car elle donne une excellente idée de l'allure de l'affection sous la forme la plus sévère.

Ce troupeau, appartenant à M. F..., de Gigondas, quartier du Queyron (Vaucluse), était composé de 60 brebis laitières ou agneaux et de 20 chèvres.

Vers le commencement de janvier, une affection caractérisée par de petits abcès sur toutes les parties du corps, par des localisations inflammatoires de la mamelle, de l'œil et des articulations fait rapidement de nombreuses victimes.

Indistinctement, les brebis, les agneaux et les chèvres étaient frappés.

Le troupeau avait reçu des animaux nouvellement achetés

au mois de novembre et provenant d'une exploitation qui est restée indemne de toute maladie.

Il a été permis de constater trois formes : l'une suraiguë, l'autre aiguë, la troisième chronique.

Forme suraiguë. — L'animal manifeste brusquement une grande faiblesse, ne mange plus, suit difficilement le troupeau et tombe paralysé du train postérieur, quelquefois des quatre membres.

La fièvre est intense, 41°5 à 42 degrés. On n'observe dans cette forme aucune localisation : l'animal meurt en deux ou trois jours, 12 brebis et 4 chèvres ont ainsi succombé.

Forme aiguë. — Moins rapide que la précédente : on constate chez la brebis et chez la chèvre des lésions de la mamelle, qui devient chaude et très douloureuse.

La sécrétion lactée est très diminuée : le lait est blanc sale, grumeleux. Des abcès se forment et s'ouvrent à maturité : il n'est pas rare de voir une mamelle avec deux ou trois abcès en voie d'évolution et un ou deux abcès ouverts. La mamelle reste atrophiée, molle, avec des noyaux indurés : elle est perdue pour la lactation.

Les accidents articulaires se manifestent principalement aux genoux et aux jarrets. Ils s'annoncent par une boiterie très grave : on observe ensuite des lésions d'arthrite et de péri-arthrite. Les animaux restent couchés, immobiles, car tout déplacement est douloureux.

Les abcès péri-articulaires s'ouvrent et la suppuration est très longue à se tarir. Enfin on peut observer de l'ankylose. Dans ces cas l'articulation ne s'ouvre pas, elle reste engorgée, les gaines sont distendues.

La localisation oculaire est très fréquente : elle commence par de l'opacité de la cornée qui augmente peu à peu et devient complète.

La conjonctive se tuméfie, le pourtour de l'œil devient rouge, la cornée s'ulcère et on constate du pus dans la chambre antérieure. A ce moment, l'œil est volumineux, l'irritation causée par l'écoulement du pus sur la face donne à la tête un aspect hideux.

Quelquefois ces lésions, lorsqu'elles ne sont pas graves s'amendent, cette forme évolue en vingt à trente jours ; elle est mortelle dans 80 p. 100 des cas.

Tous les agneaux dont les mères étaient malades ont rapidement succombé à la faim et à la maladie.

Forme chronique. — Les 16 animaux qui ont résisté, 3 chèvres, 9 brebis et 4 agneaux, ont vu les accidents s'atténuer et ont pris la forme chronique.

Les malades se remettent lentement et très difficilement : les chèvres et les brebis ne pourront plus fournir de lait. Dans 90 p. 100 des cas on a constaté des lésions oculaires et des mamelles ; dans 50 p. 100, des lésions articulaires existaient.

En résumé : sur 80 bêtes, on ne compte que 16 survivants ; toutes ont été malades et 64 ont succombé.

Les observations de M. Arlaud, consignées dans son rapport annuel, concordent avec celles faites par M. Pleindoux ; cependant, et pour des raisons insoupçonnées, la maladie a été beaucoup moins sévère dans les Basses-Alpes qu'en Vaucluse.

M. Arlaud écrit en effet : « La mort est l'exception, mais les cas de guérison sont rares ; la plupart des sujets atteints maigrissent considérablement et continuent à s'entretenir péniblement dans cet état de maigreur, si bien que le propriétaire se décide à les abattre.

Le mal de Lure est une maladie infectieuse dont la contagion se fait lentement : c'est ainsi que dans un troupeau de 300 bêtes, où la maladie règne depuis six mois, il y a eu 50 malades. »

M. Arlaud signale, de plus, que le mal de Lure ne sévit pas sur les chèvres ; il ne semble pas avoir constaté la localisation mammaire.

On voit, par cet exposé, combien l'affection est variable, dans ses lésions et dans sa gravité.

NATURE DE LA MALADIE

Les localisations si particulières de la maladie, aux yeux, aux articulations et à la mamelle devaient logiquement faire penser à l'agalaxie contagieuse.

Cependant, de l'aveu même des auteurs qui ont tenté l'étude bactériologique de l'agalaxie, Hess et Guillebeau, Oreste et Marcone, Bournay et Leclainche, Celli et de Blasi, aucun microbe ne s'est montré capable de reproduire la maladie.

Oreste et Marcone isolent bien du lait quatre espèces de cocci, mais ils n'osent accorder la spécificité à aucun d'eux. Bournay et Leclainche n'ont rien obtenu avec les produits recueillis purement au niveau des lésions chroniques de l'œil et des articulations; des ensemencements sur différents milieux, à l'air et dans le vide, restèrent stériles presque toujours.

Enfin, les beaux travaux de Celli et de Blasi conduisent ces auteurs à la découverte d'un virus filtrant qui permet de reproduire l'agalaxie et ses différentes localisations.

Nos collègues italiens, qui ont eu à leur disposition un vaste champ d'observation, puisque l'agalaxie sévit chaque année sur plusieurs milliers de moutons des provinces centrales et méridionales de l'Italie, signalent la rareté des complications purulentes dans la mamelle et celle, encore plus grande, des suppurations de l'œil et des articulations.

Ils sont complètement muets au sujet des microorganismes qu'ils ont pu rencontrer dans ces rares lésions purulentes.

A coup sûr, si le microbe que nous avons étudié dans le mal de Lure était tombé sous les yeux des observateurs précités, leur attention eût été attirée sur lui.

Étant donné que, dans le mal de Lure, la suppuration était la règle, que, d'autre part, soit sur les animaux atteints de la maladie naturelle, soit sur les animaux d'expériences, je constatais des lésions non décrites dans l'agalaxie, j'étais prêt à regarder, avec nos confrères des Basses-Alpes, le mal de Lure comme une affection constituant une entité morbide spéciale et toute nouvelle.

Cependant, si l'expérimentation me permettait de reproduire les lésions purulentes du mal de Lure, elle me montrait aussi que le microbe isolé par moi était incapable d'amener l'état cachectique constaté dans la maladie naturelle. Des brebis, inoculées expérimentalement et présentant de volumineux abcès mammaires, continuaient, pendant de longs mois, à jouir d'un excellent état de santé général et finissaient pas se débarrasser de toutes leurs lésions.

Je tins à voir de près des animaux atteints d'agalaxie. M. Scoffié, vétérinaire départemental des Alpes-Maritimes, et M. Eyriès, vétérinaire à Carpentras, avec une obligeance dont je ne saurais trop les remercier, me firent envoyer plusieurs sujets.

Sur les 6 brebis de M. Eyriès, je pus isoler le microbe d'une seule mamelle, et une chèvre du lot de M. Scoffié, présentant des lésions oculaires et mammaires, me montra bien le bacille dans le pus de l'œil, mais le lait altéré de la mamelle ne le renfermait pas et cependant *ce lait et le filtrat de ce lait* infectèrent 3 moutons par la veine, et 2 brebis par la mamelle.

Il devenait évident que les lésions purulentes renfermant le bacille ne constituaient qu'une complication secondaire de l'agalaxie.

Le mal de Lure n'est donc qu'une infection qui vient se greffer sur l'agalaxie : son microbe est cependant spécifique, c'est un nouveau bacille pyogène doué d'une certaine virulence, auquel j'ai donné le nom de *pyobacille du mouton et de la chèvre*.

Sa présence augmente de beaucoup la gravité de l'infection primitive, ses caractères biologiques sont intéressants à plus d'un titre; pour ces raisons j'ai cru devoir en faire une étude un peu approfondie.

CLINIQUE

La description qui suit s'applique, il convient de le noter, à des animaux atteints à la fois d'agalaxie et de mal de Lure. Nous n'insisterons que sur les lésions dans lesquelles nous avons constaté la présence du pyobacille ou qui, malgré l'absence de cet agent pathogène, nous paraissent cependant sous sa dépendance. Nous éclaircirons ce point dans la suite.

N° 420 (Forcalquier). Vieille brebis très maigre : la station quadrupédale est impossible, l'animal marche sur ses genoux qui sont volumineux, aplatis, indurés et indolores.

Nous ferons observer de suite que cette position est fréquemment constatée sur les malades atteints de la maladie naturelle ou infectés artificiellement.

L'œil gauche, enfoncé dans l'orbite souillée par un pus jaunâtre, et caché par les paupières, est complètement atrophié : le pus s'écoule de la cavité orbitaire sur la joue et le chanfrein en se desséchant.

La chambre antérieure renferme quelques gouttes de pus liquide, jaune verdâtre, qui sort facilement par une fistule centrale de la cornée, située au fond d'un infundibulum.

La sérosité articulaire se montre stérile : le pus de l'œil, par contre, fai voir en abondance le pyobacille associé à un organisme cocciforme, ne prenant pas le Gram, coccus que nous avons rencontré souvent dans la suite et qui s'est montré dépourvu de tout pouvoir pathogène.

N° 440 (Gigondas). Ophtalmie purulente de l'œil gauche, dont le pus est d'une richesse extrême en pyobacilles (fig. 1, Pl. IV).

N° 441 (Gigondas). Brebis de 2 ans, en assez bon état. Les mamelles sont augmentées de volume, bosselées. La palpation fait constater la présence de plusieurs noyaux profonds, fermes, gros comme des noix.

Ces noyaux renferment du pus vert pâle, crémeux : l'un d'eux s'est ouvert, laissant une petite poche suppurante. Le pus est très riche en pyobacilles.

N° 445. Brebis de 2 ans, en très mauvais état. Ophtalmie de l'œil droit. A travers la cornée sort et s'étale un tissu blanchâtre qu'il est impossible de détacher avec une pince : il s'arrache en lambeaux et paraît fixé au fond de l'œil.

L'extrémité libre du cartilage de l'oreille droite est nécrosée : la pression sur la peau, à ce niveau, fait sourdre quelques gouttes de pus verdâtre très riche en pyobacilles. (La nécrose de l'extrémité de l'oreille est fréquente sur les animaux atteints d'agalaxie et cependant je n'ai trouvé cette lésion signalée chez aucun auteur.) Le genou droit est le siège d'un engorgement chaud et douloureux; avec des points fluctuants; l'animal boite d'une façon intense.

La ponction d'un des points fluctuants donne écoulement à du pus crémeux, verdâtre, *stérile à la culture.*

N° 409. Vieille brebis maigre d'origine inconnue. Mamelles bosselées par des noyaux indurés : une fistule, communiquant avec l'un d'eux, donne du pus liquide, verdâtre, très riche en pyobacilles.

N° 502. Vieille brebis en très mauvais état d'origine inconnue.

A l'autopsie, un des ganglions mésentériques a le volume d'un œuf de poule et renferme du pus verdâtre, crémeux, d'une extrême richesse en pyobacille, paraissant pur au microscope.

N° 510. Chèvre (Nice). L'œil droit porte une fistule centrale donnant par la pression du pus verdâtre très riche en pyobacilles (fig. 2, Pl. IV).

N° 529 (Carpentras). Brebis maigre. La mamelle droite renferme du pus verdâtre qui, ensemencé en bouillon sérum, donne une culture mixte de pyobacille et de streptocoque.

Dans toutes les lésions renfermant le pyobacille, le pus s'est montré crémeux, homogène, sans odeur, vert pâle : le microbe y est facilement constaté car son abondance est extrême, en général.

Nous l'avons donc rencontré dans l'œil, dans la mamelle, dans un ganglion et sous la peau du cartilage auriculaire nécrosé, mais jamais dans le pus articulaire. Celui-ci s'est toujours montré stérile; disons de suite qu'il en fut presque toujours de même chez les animaux infectés artificiellement.

BACTÉRIOLOGIE

Les produits pathologiques examinés furent récoltés sur des animaux provenant des Basses-Alpes, de la Vaucluse et des Alpes-Maritimes, ou achetés au marché de la Villette et provenant des régions infectées.

L'examen du pus extrait de la chambre antérieure (4 cas), de la mamelle (3 cas), d'un chancre de l'oreille (1 cas), d'un ganglion mésentérique (1 cas) nous a montré, toujours en abondance, le pyobacille, associé parfois à un fin coccus ne prenant pas le Gram, et paraissant dénué de toute virulence. Ce coccus, injecté sous la peau, dans un trayon, dans l'œil, dans la veine de moutons ou de brebis, a été incapable de créer une lésion quelconque.

Chose curieuse, le pus des lésions articulaires (4 cas) s'est toujours montré stérile : nous tenons à faire remarquer de nouveau que le pus articulaire des animaux infectés expérimentalement était également stérile le plus souvent. Mais si la dose injectée, dans la veine, est un peu forte, les abcès articulaires et péri-articulaires se montrent d'une richesse extrême en pyobacilles. Il y a là une question de dose, très probablement, le pouvoir bactériolytique du pus se trouvant débordé par un apport exagéré de germes virulents.

Quoi qu'il en soit, lorsque le pyobacille existe dans le pus, il s'y montre en général très abondant; si dans les lésions ouvertes il est accompagné d'autres espèces microbiennes, sa forme permet de le distinguer aisément.

Avec un faible grossissement (1000-1200 D), il ressemble à s'y méprendre au bacille du rouget. C'est un bacille très grêle, en articles d'inégale longueur, très polymorphes, libres ou en petits amas enchevêtrés.

Un objectif puissant est indispensable pour mieux apprécier la grande variété de formes qu'il affecte, allant du coccus au bacille, avec des articles renflés en leur centre ou à l'une de leurs extrémités (Pl. IV, fig. 3).

Le plus grand nombre des éléments, colorés par le Gram, qu'ils prennent parfaitement, paraissent composés d'un grain ou d'une série de deux, trois grains colorés en violet foncé, inclus dans une enveloppe plus claire, effilée à l'une ou aux deux extrémités.

CULTURES

La culture en bouillon peptone est nulle ou à peine appréciable ; la présence d'un sérum, même en faible quantité, est indispensable pour obtenir un développement d'une certaine

importance ; la culture est complète en quatre ou cinq jours, le milieu devient fortement acide.

La culture se fait en profondeur, au contact de la paroi du tube si celui-ci est incliné au lieu d'être maintenu debout : cette paroi se recouvre d'une couche grisâtre paraissant formée de petits amas microbiens séparés. Le liquide ne se trouble pas.

Une agitation modérée du tube met en suspension ces petits amas ; si l'on insiste, tout se désagrège et le liquide se trouble uniformément, mais la sédimentation s'opère assez rapidement et le milieu reprend sa limpidité initiale.

La présence de craie dans le bouillon peptone sans sérum permet un développement assez appréciable ; il n'y a jamais de dégagement gazeux, mais production d'une faible quantité d'indol.

Le sérum (mouton, chèvre) constitue un bon milieu de culture ; dans le lait, le développement est rapide (brebis, chèvre, vache) : le milieu est coagulé en dix-huit ou vingt-quatre heures, très acide, sans dégagement de gaz.

La gélose sérum montre une couche très mince, translucide, surtout appréciable au contact du liquide de condensation.

La gélatine, la gélose ordinaires, la pomme de terre, le sérum coagulé paraissent impropres à la culture du pyobacille.

A la température du laboratoire, on n'observe aucun développement. Enfin, les cultures anaérobies sont peut-être plus riches que celles qui s'effectuent au contact de l'air : le pyobacille est un anaérobie facultatif. Il est immobile.

Ce microbe ne se développe pas sur la gélose ordinaire ; si l'on ensemence du pus sur ce milieu, le coccus non virulent, souvent associé au pyobacille, y pousse rapidement. Bientôt, par-dessus les colonies assez translucides de ce coccus, apparaîtront d'autres colonies plus petites, mais plus opaques, de pyobacilles.

Ces colonies de pyobacilles sont incomparablement plus riches, dans ce cas, que sur la gélose sérum elle-même.

Pour isoler le pyobacille des autres variétés microbiennes qui peuvent éventuellement l'accompagner, il est indispensable d'utiliser la gélose sérum ou, mieux, la gélose sang ; la teinte foncée de ce dernier milieu permet une différenciation plus aisée des colonies : dans les espaces libres laissés entre les

colonies volumineuses des autres microbes, on verra apparaître un fin piqueté composé de colonies de pyobacilles. Leur apparition sera toujours en retard de vingt-quatre, quarante-huit heures sur celle des autres microbes.

On réussira encore à obtenir le pyobacille à l'état pur en pratiquant deux ou trois passages, de péritoine à péritoine, chez le cobaye.

Le pyobacille perd manifestement de sa virulence quand on le cultive en série sans passage par l'organisme animal.

Malgré l'acidité des milieux dans lesquels il se développe, le pyobacille conserve sa vitalité au moins deux mois à la température du laboratoire.

EXPÉRIMENTATION SUR LES DIFFÉRENTS ANIMAUX

Cobaye.

L'injection de 1 cent. cube de culture sous la peau provoque un œdème assez étendu et épais, qui se condense ; une petite poche purulente apparaît, s'ouvre au bout de deux à quatre jours, laissant une plaie ulcéreuse ; puis la cicatrisation s'opère assez rapidement : l'animal conserve un excellent état de santé et guérit.

Dans le péritoine, l'injection de 1-2 cent. cube *de culture* tue parfois l'animal en cinq à huit jours, dans un état cachectique complet. La séreuse péritonéale renferme un exsudat louche, plus ou moins teinté en rouge ; des fausses membranes sont disséminées à la surface des viscères et les anses intestinales sont accolées les unes aux autres. Sur le péritoine pariétal et l'épiploon sont répartis de petits abcès recouverts d'une mince enveloppe et renfermant une gouttelette de pus vert pâle d'une richesse extrême en pyobacilles. L'urine est albumineuse.

L'injection intra-péritonéale *de pus*, provenant d'une lésion du mouton ou de cobaye, provoque, au bout de deux ou trois jours, chez le cobaye mâle, une funiculite suppurée : un des testicules, ou les deux, ne peuvent plus rentrer dans la cavité abdominale ; le scrotum est tendu, rouge, luisant. A l'autopsie, on constate l'adhérence des feuillets séreux de la gaine vaginale et une quantité plus ou moins grande de pus ; le testicule dont le tissu propre peut être lésé est fixé au fond de la gaine vaginale.

Le Veau (20 cent. cubes dans la veine), le Lapin (1 cent. cube dans la veine), le Pigeon (1 cent. cube dans le muscle), la Souris blanche (1 cent. cube dans le péritoine) se montrent réfractaires au pyobacille.

20 cent. cubes de culture sous la peau du cheval ne donnent lieu à aucun trouble local ou général ; cependant 100 cent. cubes dans la veine provoquent une brève élévation thermique.

Mouton et Chèvre.

I. — *Injection sous la peau.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an (nº 430) né au laboratoire reçoit sous la peau de la cuisse droite 5 cent. cubes d'une culture de pyobacille en bouillon sérum âgée de trois jours. Le lendemain, un œdème chaud et douloureux, du volume d'un œuf de poule, entoure le point d'inoculation. La fluctuation apparaît dans les jours qui suivent. La poche purulente s'ouvre spontanément le 10 février et se vide, laissant une plaie profonde qui se comble rapidement.

Le 8 mars, la cicatrice est à peine visible. La température, qui s'est maintenue au-dessus de 40 degrés (max. 40°8) pendant quatre jours, descend ensuite lentement vers la normale qu'elle a repris le 10ᵉ jour.

L'animal n'a pas présenté d'autres lésions et a toujours conservé un état de santé général excellent.

Le 17 février, trois agneaux de trois semaines, nés au laboratoire, sont inoculés sous la peau de la cuisse droite :

Le nº 437 reçoit 1 goutte de culture :

Le nº 438 reçoit 2 gouttes ;

Le nº 439 reçoit 5 gouttes.

Seuls, les nºˢ 438 et 439 présentent chacun un volumineux abcès qui évolue et se cicatrise rapidement ; cependant, l'engraissement et l'augmentation de taille ont été nettement retardés, surtout chez le 439.

Le nº 437 n'a montré aucune trace de l'inoculation et a pris un embonpoint normal.

D'autres animaux, d'âges différents, ont encore reçu sous la peau des doses variables de pyobacilles : ces inoculations ont été bien supportées ; en tout cas, il n'y eut jamais généralisation de l'infection.

II. — *Injection dans le péritoine.*

Le 5 février 1911, une brebis d'un an, nº 429, née au laboratoire, reçoit dans le péritoine 5 cent. cubes de culture de pyobacille. L'animal maigrit rapidement : sa température oscille entre 40°5 et 41 degrés. Sacrifiée le 17 mars, de nombreuses adhérences réunissent les anses intestinales entre elles et à la paroi abdominale.

A la surface des intestins, on rencontre de nombreuses petites élévations rosées, en saillie de 1 à 1 cent. 1/2 et renfermant quelques gouttes de pus verdâtre renfermées dans une capsule charnue. Trois gros abcès, au niveau de la ligne blanche, font saillie sous la tunique abdominale.

Le pus de ces lésions est d'une richesse extrême en pyobacilles.

III. — *Injection dans l'œil.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an, n° 427, né au laboratoire, reçoit dans la chambre antérieure de l'œil droit une goutte de culture en bouillon sérum.

Dès le lendemain la cornée est opaque. Le 8, le contenu de l'œil est nettement purulent : la sclérotique est violemment congestionnée. La cornée s'ulcère et laisse sortir du pus verdâtre. Le 21, une gelée incolore, constituée par le cristallin, fait hernie par la perforation cornéenne. L'œil s'atrophie de plus en plus et les paupières le recouvrent complètement. Sacrifié le 19 mai, cet animal est en parfait état de graisse : l'œil est complètement atrophié ; la chambre antérieure n'existe plus, le globe oculaire forme une petite masse uniformément noire sur la coupe. Aucune autre lésion.

IV. — *Injection dans la mamelle.*

Le 5 février 1911, une brebis d'un an, n° 429, née au laboratoire, reçoit dans le trayon droit 1 cent. cube de culture de pyobacille. Le 8, on sent, dans la profondeur de l'organe, à la base du trayon, une induration du volume d'un œuf de pigeon.

Un mois après, on perçoit trois noyaux indurés. La ponction de ces noyaux donne issue à du pus verdâtre, crémeux, très riche en pyobacilles.

Une brebis de quatre ans, en pleine lactation, n° 449, reçoit le 21 mars 1911, une goutte de culture dans le trayon gauche. Dès le 23, la mamelle gauche est énorme, tendue, rouge, douloureuse ; du trayon, on fait sortir du pus verdâtre. Bientôt l'autre quartier s'infecte également : on sent, dans la profondeur de l'organe, des noyaux durs. Au 9 septembre, cette brebis, qui a toujours conservé un excellent état de santé, a le tissu mammaire complètement atrophié, mais on perçoit encore de petits noyaux indurés.

Au 13 novembre, toute trace d'infection semble avoir disparu.

V. — *Injection dans le vagin.*

A une vieille brebis, n° 454, en état de gestation, on injecte le 7 février, dans le vagin, 20 cent. cubes de culture : elle met bas, le 29 mars, une agnelle mort-née.

Les liquides amniotique et allantoïdien sont purulents, très riches en pyobacilles. Dans les jours qui suivent l'avortement, la vulve laisse écouler un mucus purulent et sanguinolent.

Le sang du cœur de l'avorton est stérile. Sacrifiée le 5 avril, cette brebis montre une métrite purulente ; l'utérus renferme un exsudat grisâtre peu abondant, avec grumeaux muqueux, culture mixte de pyobacilles et de streptocoque.

VI. — *Ingestion de pyobacilles.*

Le 15 avril 1911, on verse, dans la bouche de chacun des agneaux 484 et 485, âgés de trois semaines, le tiers environ d'un tube de culture en bouillon sérum. Le 28 avril, apparition d'une boiterie au membre postérieur droit. Le jarret droit s'engorge peu à peu, et, le 15 mai, montre un point fluctuant en avant. La ponction permet d'obtenir 2 cent. cubes de sérosité louche, jaunâtre, avec leucocytes, mais sans microbes au microscope. Cette sérosité, ensemencée, s'est montrée stérile.

N° 485. — Boîte du membre antérieur droit le 22 avril ; le 24, le genou antérieur droit est augmenté de volume, chaud, douloureux, l'animal reste couché. Le 10 mai apparaît, à la face interne, un point fluctuant.

La ponction permet de recueillir de la sérosité rougeâtre avec grumeaux purulents. L'examen microscopique et la culture font voir que cette sérosité est stérile.

L'infection par le tube digestif est donc possible expérimentalement. Nous en étions déjà persuadé à la suite de la découverte, sur un mouton atteint de la maladie naturelle, d'un volumineux abcès ganglionnaire mésentérique rempli de pus très riche en pyobacilles.

Les deux agneaux 484 et 485 s'étant complètement retablis n'ont pas été sacrifiés.

VII. — *Injection dans la veine.*

Le 5 février 1911, un mouton d'un an, n° 428, né au laboratoire, reçoit dans la jugulaire 1 cent. cube de culture de pyobacille en bouillon sérum, âgée de trois jours.

Le 10 février, apparition d'une boiterie accentuée du membre postérieur droit ; l'animal maigrit à vue d'œil et ne peut bientôt plus se porter sur le membre malade. Sacrifié le 10 mars, ce mouton est d'une maigreur extrême. L'articulation fémoro-tibiale droite est augmentée de volume, noyée dans un engorgement diffus ; en dégageant les muscles et les tendons qui l'enveloppent, on incise de petites poches purulentes. Les cartilages articulaires sont détruits ; la surface des épiphyses est vivement enflammée, verruqueuse. La tête du fémur renferme un abcès gros comme une noisette (Pl. IV, fig. 4). Le pus verdâtre des lésions articulaires, péri-articulaires et osseuse est d'une grande richesse en pyobacilles. Le ganglion du flanc droit est énorme, succulent, long de 8 centimètres.

Aucune autre lésion.

Le 31 mars, une chèvre adulte, n° 464, reçoit dans la jugulaire 5 cent. cubes de culture. Le 3 avril, la chèvre présente de la raideur des quatre membres : le poil est piqué ; le 4, elle boite du membre postérieur droit qui est rapidement soustrait à l'appui ; la palpation de l'articulation fémoro-tibiale est très douloureuse.

A partir du 16, l'animal ne peut plus se tenir debout. De nouvelles localisations apparaissent aux genoux, droit et gauche, puis au jarret gauche. On la sacrifie le 29 avril, elle est complètement cachectique. Sous la plèvre, on rencontre quelques petits abcès avec pus verdâtre riche en pyobacilles. Les articulations malades sont entourées d'abcès dont le pus a fusé entre les muscles et les brides tendineuses en les décollant. Les surfaces articulaires n'existent plus et sont remplacées par des surfaces tomenteuses, rugueuses, enflammées. La tête du fémur gauche renferme un petit abcès en communication avec l'articulation. Les ganglions de la voûte lombaire et poplité sont énormes, succulents, mais non purulents.

LÉSIONS

Articulations. — L'articulation et les tissus environnants, conjonctif, osseux, peuvent être envahis par la suppuration. L'articulation est augmentée de volume, chaude, douloureuse :

de petits abcès plus ou moins confluents s'établissent entre les brides tendineuses et les muscles, qu'ils décollent. Les culs-de-sac tendineux et articulaires renferment du pus verdâtre et font saillie sous la peau.

Si l'articulation elle-même est envahie, le pus macère les cartilages articulaires, les détruit, laissant à leur place des surfaces tomenteuses, rugueuses, vivement enflammées.

L'inflammation ne va pas toujours jusqu'à la formation de pus et la ponction d'un point fluctuant de l'articulation peut ne donner issue qu'à de la synovie épaisse, d'une teinte rosée ou jaune plus ou moins intense. Parfois, enfin, la seule lésion consiste en un engorgement diffus des tissus au niveau de l'articulation.

Os (Lésion expérimentale). — La tête des os longs, au niveau d'une articulation malade, renferme parfois un ou deux petits abcès avec pus verdâtre ; la moelle osseuse peut être transparente, gélatiniforme, les vaisseaux capillaires s'y distinguent dans presque toute l'épaisseur du tissu.

Mamelle. — La lésion mammaire est constituée par des abcès plus ou moins nombreux, volumineux et profonds. Les conduits galactophores peuvent s'infecter et la mulsion permet d'obtenir par les trayons une quantité variable de pus épais, crémeux, verdâtre.

Certains de ces abcès s'ouvrent à l'extérieur et laissent une poche ou une fistule, dont la cicatrisation est très lente à s'opérer.

D'autres se résorbent au bout de quelques mois, et la mamelle reste complètement atrophiée.

Ganglions. — Nous avons rencontré, sur un animal atteint de la maladie naturelle, un volumineux abcès mésentérique avec pus d'une extrême richesse en pyobacilles.

Œil. — Le pus se forme dans la chambre antérieure : sous la pression interne, la cornée est refoulée en avant ; elle s'amincit en son centre, puis se déchire ; par la fistule ainsi créée, une petite quantité de pus s'écoule avec des fragments de tissus macérés.

Deux fois, nous avons constaté la sortie, par la fistule centrale de la cornée, d'un tissu blanchâtre s'étalant à la surface de l'œil, très fragile et semblant fixé au fond de l'œil.

La petite quantité de pus reste renfermée dans la chambre antérieure dès que la pression est égalisée; pour en obtenir une goutte, il convient de presser sur la cornée.

Le pus qui souille les paupières et s'écoule sur le chanfrein et les joues ne vient pas de l'intérieur de l'œil; il est créé *in situ* dans la cavité orbitaire souillée par les poussières et dont la profondeur varie avec l'état d'atrophie du globe oculaire et sa rétraction au fond de l'orbite.

Fait curieux, malgré la présence de pus dans la chambre antérieure pendant deux ou trois mois parfois, l'œil peut reprendre, en apparence, sa forme et presque son aspect normal; la vision est abolie, bien entendu. Mais, le plus souvent, le globe oculaire est complètement atrophié, rétracté au fond de l'orbite; une coupe de l'organe ne permet plus de différencier les différents tissus; il est uniformément noir, comme une petite truffe.

Cartilage auriculaire. — Nous avons signalé la grande fréquence de la nécrose du cartilage de l'oreille chez les animaux agalaxiques. Chez l'un d'eux, l'extrémité de l'oreille était le siège d'un chancre purulent; sous la peau, décollée, existait du pus verdâtre, très riche en pyobacilles.

Utérus (Lésion expérimentale). — L'utérus renferme un exsudat purulent grisâtre; les liquides amniotique et allantoïdien sont rougeâtres, purulents.

ÉTIOLOGIE

La clinique et l'expérimentation montrent que l'infection par le pyobacille se réalise par les voies digestives.

Nous avons rencontré, sur une brebis atteinte de la maladie naturelle, un volumineux abcès mésentérique à pus très riche en pyobacilles; de plus, par l'absorption d'une culture de pyobacilles, nous avons réussi à provoquer, chez deux agneaux, des lésions articulaires très nettes, mais fugaces.

Mais le tube digestif de l'animal sain et adulte ne semble pas se prêter au passage du pyobacille et à l'infection consécutive.

Pour créer des lésions comparables à celles de la maladie naturelle il convient d'injecter le virus dans la veine ou dans l'organe lui-même, œil et mamelle.

L'injection intra-veineuse amène à coup sûr des lésions articulaires et, parfois, des lésions oculaires et mammaires.

Pour que l'infection se réalise normalement, il faut de toute nécessité que l'organisme soit déjà fortement déprimé : cette dépression organique est réalisée par le virus de l'agalaxie.

Les animaux atteints d'agalaxie sont en général en très mauvais état et l'on conçoit très bien qu'ils soient aptes à se laisser infecter par un agent doué d'un certain pouvoir pathogène, insuffisant toutefois pour vaincre la résistance d'un animal sain.

Le pyobacille doit être assez répandu dans les bergeries : nous croyons l'avoir entrevu dans le pus du moignon de la queue chez des agneaux du Loiret, à une époque où notre attention n'avait pas encore été attirée spécialement sur lui; aucun symptôme se rattachant au mal de Lure n'a été constaté d'ailleurs dans la suite chez ces agneaux.

Le mal de Lure est localisé dans les Basses-Alpes, la Vaucluse, le Var et les Alpes-Maritimes, c'est-à-dire dans les régions où sévit l'agalaxie contagieuse.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

Le mal de Lure n'a rien de commun avec les différentes lésions créées par le microbe de la suppuration caséeuse. On peut rencontrer sur le même animal des abcès sous-cutanés et viscéraux (poumon) renfermant le microbe de Preisz-Nocard, et des lésions suppurées contenant le pyobacille, mais ces deux agents pathogènes ne se mélangent pas. Chacun d'eux se développe séparément et donne naissance aux lésions qui lui sont propres.

L'examen microscopique et les cultures seront nécessaires cependant pour différencier les suppurations articulaires et mammaires; cliniquement on ne peut les distinguer. Mais la suppuration de l'œil est absolument le fait du pyobacille.

Je crois devoir attirer l'attention sur les difficultés rencontrées à chaque pas dans l'étude de ces affections mixtes sur un même animal et sur la circonspection qu'il convient d'apporter dans l'appréciation du rôle pathogène de chacun des virus.

Cependant les résultats expérimentaux sont très nets; le microbe de la suppuration caséeuse peut, à lui seul, sur l'animal sain, créer toutes les localisations bien connues actuellement, le pyobacille ne peut évoluer que sur des sujets déjà atteints d'agalaxie.

C'est dire que le mal de Lure ne saurait être constaté dans les régions indemnes de cette affection.

Le pus du mal de Lure a la même teinte verdâtre que le pus dû au microbe de Preisz-Nocard, mais jamais il n'acquiert la consistance de ce dernier, il reste toujours assez liquide.

ESSAIS DE VACCINATION

L'injection d'une goutte de culture de pyobacille vivant, non atténué, étant parfaitement tolérée, sans réaction locale le plus souvent, même chez de très jeunes animaux, nous avons logiquement été amené à tenter l'immunisation active.

A plusieurs reprises nous avons injecté, sous la peau d'animaux d'expériences d'âges différents, des doses minimes mais croissantes, de virus non atténué.

Ces injections furent bien supportées, mais l'épreuve de l'immunisation, si toutefois celle-ci était réalisée, ne nous fournit que des déboires.

Nous ne pouvions songer à essayer la résistance de nos vaccinés en leur faisant absorber des cultures de pyobacilles, puisque ce mode d'infection ne réussit qu'exceptionnellement au laboratoire.

Force nous fut d'utiliser la voie veineuse et nous dûmes constater que vaccinés et témoins se montraient aussi sensibles les uns que les autres à l'injection : l'apparition de lésions articulaires démontrait le peu de cas qu'il convenait de faire de la vaccination.

Cependant, sur quelques centaines d'animaux, en pays infecté, M. Arlaud, vétérinaire départemental des Basses-Alpes, voulut bien essayer la vaccination. Les résultats parurent satisfaisants puisque, cette année, plusieurs propriétaires m'ont demandé de nouveau du vaccin. Je me suis empressé de leur donner satisfaction, mais, personnellement, j'avoue ne pas avoir grande confiance dans la valeur de la méthode. Peut-être cette

vaccination se montrera-t-elle capable d'empêcher l'apparition des lésions suppurées, mais, à coup sûr, elle n'aura aucune action sur l'infection agalaxique primitive.

C'est contre l'agalaxie que les mesures hygiéniques et prophylactiques doivent être prises; cette maladie étant vaincue, le mal de Lure disparaîtra.

Tous nos efforts vont porter de ce côté maintenant.

CONCLUSIONS

I. — Le mal de Lure n'est qu'une complication de l'agalaxie contagieuse du mouton et de la chèvre : c'est une pyohémie spéciale.

II. — L'agent spécifique, que nous avons découvert, et auquel nous avons donné le nom de pyobacille du mouton et de la chèvre, est doué d'un pouvoir pathogène élevé.

III. — Les animaux sont d'autant plus sensibles à son action qu'ils sont plus jeunes.

IV. — Si l'injection sous-cutanée est, en général, bien tolérée, par contre, le dépôt du virus dans la veine, dans l'œil, dans la mamelle permet de réaliser l'infection et d'obtenir les lésions typiques de la maladie.

V. — Le pyobacille constitue une nouvelle variété microbienne capable de provoquer, chez le cobaye mâle, le signe de Strauss, la vaginalite et l'orchite suppurées.

VI. — Le mal de Lure est un nouvel exemple d'une infection secondaire spécifique se greffant sur une première infection et en augmentant la gravité.

VII. — Cette complication paraît absolument propre aux ovins et caprins du sud-est de la France. Elle est inconnue sur les moutons atteints d'agalaxie, en si grand nombre dans les régions centrale et méridionale de l'Italie.

VIII. — Il paraît inutile de chercher à prévenir le mal de Lure; tous les efforts prophylactiques doivent être dirigés contre l'agalaxie contagieuse, cause première de l'affaiblissement organique permettant le développement du pyobacille.

DES INFECTIONS SECONDAIRES
DANS LA TUBERCULOSE ULCÉREUSE DU POUMON

par A. VEILLON et G. REPACI

Quand on songe aux conditions dans lesquelles se trouvent la plupart des cavernes tuberculeuses, on conçoit facilement qu'elles puissent être le siège de nombreuses infections secondaires. A demi remplies de matière caséeuse, de pus, qui font un excellent milieu pour les cultures microbiennes, formées d'une paroi pathologique en voie de destruction, qui n'offre aucun moyen de défense, elles semblent vouées forcément à un envahissement parasitaire intense. Cependant, si la caverne tuberculeuse est bien disposée pour laisser pulluler les microbes, faut-il encore que ceux-ci puissent y pénétrer, il faut qu'il y ait ensemencement. La communication avec les bronches, et par suite avec le nez, la bouche et l'air extérieur, constitue une voie toute naturelle pour cette pénétration. Mais nous savons que l'air atmosphérique se purifie en passant par le nez, la bouche et les voies respiratoires supérieures car les particules solides sont retenues par les parois humides de ces cavités et nous savons aussi que les bronches se défendent par un mécanisme biologique bien connu en détruisant les microbes qui n'ont pas été retenus mécaniquement.

On conçoit donc qu'une caverne puisse échapper à l'infection secondaire et, en fait, nous verrons que cela existe. En réalité, l'abondance des sécrétions qui lèsent la muqueuse et l'empêchent de se défendre utilement, la stagnation de ces sécrétions qui arrivent à faire un milieu de culture étendu à tout l'arbre respiratoire, la permanence même de ces conditions favorisantes font qu'à un moment donné il doit se faire un ensemencement de la caverne et c'est ce que l'on constate le plus souvent.

Koch, qui avait trouvé le microbe de la tuberculose, a aussi donné les premières indications au sujet des infections secondaires.

Il fait très justement remarquer que parmi les nombreuses espèces bactériennes que le hasard fait pénétrer dans les cavernes, un petit nombre sera capable de se développer et quelques-unes seulement pourront jouer un rôle pathologique. Depuis ces recherches de Koch (1884), nombre d'auteurs (1) se sont attachés à confirmer ou infirmer le rôle pathologique de ces infections secondaires, les uns ne leur attribuant aucune importance, les autres allant jusqu'à dire que le bacille de la tuberculose ne pourrait rien sans l'aide des autres microbes.

Nous ne reviendrons pas sur l'historique de ces travaux, qui a été maintes fois fait; disons seulement que les recherches ont porté exclusivement sur l'étude des microbes aérobies et qu'il semble bien résulter de l'ensemble de ces travaux que, si l'infection secondaire par ces microbes est presque constante, elle ne semble pas jouer un rôle important.

Nous savons maintenant que le bacille de Koch à lui seul peut faire la granulation tuberculeuse, que c'est lui qui amène la dégénérescence caséeuse, qu'il est enfin capable de provoquer des inflammations pneumoniques, broncho-pneumoniques et pleurales, qu'il est la principale cause de la fièvre et de la cachexie tuberculeuse. On constate cependant, dans de nombreux cas de tuberculose ulcéreuse, des phénomènes que la seule présence du bacille de Koch ne saurait expliquer; c'est la fétidité de l'haleine, la putridité des sécrétions, l'aspect gangreneux des cavernes et enfin, dans quelques cas, un pyopneumothorax à épanchement putride.

Il semble que ce côté des infections secondaires, dans la tuberculose pulmonaire, ait été négligé par tous les auteurs qui se sont occupés de la question, et c'est pour cela que nous avons entrepris de nouvelles recherches sur ce sujet.

Technique.

Pour nos examens nous nous sommes servis des crachats de malades atteints de tuberculose ulcéreuse, des sécrétions recueillies dans l'intérieur des cavernes au cours des autopsies

(1) On trouvera l'analyse de ces travaux et les indications bibliographiques dans la thèse de Halbron. Tuberculose et infections associées. *Thèse de Paris*, 1906.

et enfin du tissu pulmonaire lui-même; dans quelques cas nous avons aussi examiné le pus de pleurésies, le sang de la circulation générale, etc.

Pour les crachats nous faisons expectorer le malade dans une boîte de Petri stérilisée et, immédiatement, un petit fragment est détaché avec un instrument flambé.

Ce petit fragment, lavé successivement dans plusieurs tubes (7 à 8) d'eau stérilisée, servait ensuite aux examens microscopiques, aux ensemencements, aux inoculations. Cette technique est d'ailleurs classique pour l'étude des crachats, car elle permet d'éliminer en grande partie les microbes de la bouche.

Les sécrétions des cavernes, le suc pulmonaire, le sang du cœur étaient recueillis comme d'habitude avec des pipettes flambées qui servaient à aspirer le liquide à travers une paroi préalablement stérilisée par le fer rouge.

Le matériel, ainsi recueilli avec toutes les précautions d'asepsie, était soumis à trois ordres de recherches : examen microscopique à l'état frais et après coloration par des procédés variés; cultures sur différents milieux; inoculations à la souris, au lapin, au cobaye.

Dans ces différentes manipulations, nous nous sommes toujours attachés à employer des méthodes multiples pour pouvoir mettre en lumière le plus grand nombre d'espèces bactériennes. Dans une question aussi complexe, il fallait en effet éviter l'écueil qui consiste à ne trouver qu'une ou deux espèces bactériennes dans un cas où il en existe beaucoup d'autres, ou bien à ne trouver que l'espèce qu'on recherche *a priori*.

Les résultats concordants des cultures et des préparations faites directement avec le matériel ensemencé nous prouvaient que notre technique était bonne. Donc, pour chaque cas, on faisait des préparations à l'état frais, des préparations colorées par la méthode de Gram, par le liquide de Ziehl dilué, par le liquide de Ziehl à chaud suivi d'une décoloration par l'acide nitrique dilué au tiers.

Les ensemencements pour cultures d'aérobies étaient faits sur tubes de gélose ordinaire, sur tubes de gélose ensanglantée, tubes de gélose ascite et sérum coagulé; pour les cultures des anaérobies nous avons employé les tubes de gélose sucrée en couche profonde.

Pour faire les ensemencements en surfaces on prend le matériel avec une aiguille de platine flambée, et on le porte sur la surface d'un tube de gélose ; on a soin de délayer le petit fragment de crachat ou de pus dans le liquide exsudé au fond du tube et on l'étale sur la surface de gélose ; sans recharger l'aiguille, on recommence la même opération sur un second, un troisième tube, etc. On fait ainsi de véritables plaques en surface où toutes les colonies poussent bien isolées. On ensemence plus ou moins de tubes, selon la richesse bactérienne du matériel.

Pour pratiquer l'isolement des microbes anaérobies, nous avons employé la technique indiquée par l'un de nous et que nous décrirons rapidement à nouveau, parce qu'il semble qu'elle n'ait pas toujours été bien comprise et parce qu'elle a subi des perfectionnements depuis qu'elle a été publiée.

Le milieu que nous employons est de la gélose à 10 p. 1000, préparée avec la macération habituelle de viande (500 grammes pour 1000 d'eau) ; on y ajoute 5 grammes de sel marin, 10 grammes de peptone, 15 grammes de glucose et 1 gramme de nitrate de potasse (1). Le mélange cuit à l'autoclave est alcalinisé et collé avec du blanc d'œuf, chauffé à nouveau, filtré sur papier Chardin, distribué dans des tubes et stérilisé comme d'habitude. Il faut emplir les tubes sur une hauteur d'environ 10 centimètres. Le milieu doit être très clair et transparent.

Pour faire l'ensemencement, on fait fondre au bain-marie à 100 degrés un nombre de tubes proportionné à la richesse en microbes du produit à examiner (une dizaine de tubes environ). On les fait refroidir dans de l'eau à 38 degrés, puis, se servant d'une pipette à longue effilure comme d'une aiguille de platine, on prélève un peu de semence et on secoue la pipette successivement dans les tubes, sans la recharger, pour faire des dilutions. Les tubes sont plongés dans l'eau froide pour les solidifier et ensuite mis à l'étuve. Si les dilutions ont été bien faites, les colonies se développent bien séparées les unes des autres. Les microbes aérobies stricts poussent dans la zone supérieure aérée, qui n'excède pas deux centimètres de hauteur; les anaérobies stricts ne poussent que dans la zone inférieure privée d'oxygène. Les facultatifs évidemment poussent dans toute la hauteur du tube.

Pour faire la prise des colonies on se sert d'une pipette à longue effilure, brisée à l'extrémité, qu'on introduit à travers le milieu après flambage, jusqu'à la colonie qu'on désire prélever, et on la fait monter dans la pipette par de très légers mouvements de va-et-vient.

Pour cette pêche de la colonie, il est préférable de se servir du tube Guillemot. Pour cela on prend un tube de caoutchouc souple de calibre propor-

(1) Le nitrate de potasse est ajouté au milieu pour empêcher la production des bulles de gaz (hydrogène) qui fragmentent la gélose et empêchent l'isolement. Voir Veillon et Mazé. De l'emploi des nitrates pour la culture et l'isolement des microbes anaérobies. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 janvier 1910.

tionné aux pipettes employées, long environ de 40 centimètres. On fixe une de ses extrémités à la pipette et l'autre extrémité est reçue dans la bouche. Il est alors facile, en aspirant légèrement, de cueillir la colonie qu'on touche avec l'extrémité de la pipette effilée. Bien entendu, au cours de ce prélèvement, il faut avoir soin de faire cheminer l'effilure de la pipette entre les diverses colonies et de ne toucher que celle qu'on veut prélever pour pouvoir obtenir des cultures pures. La petite portion de colonie ainsi prélevée est transplantée avec les soins habituels dans un autre tube préalablement fondu, on chasse la colonie de la pipette en soufflant légèrement par le tube de caoutchouc. On obtient ainsi des cultures pures de toutes les colonies qu'on a choisies.

Pour ensemencer dans la gélatine, on suit le même procédé. On se sert ensuite des cultures pures pour faire des ensemencements dans le bouillon ou sur différents milieux par les procédés classiques.

Nous avons dit, ailleurs, les avantages de ce procédé d'isolement ; il a continué à donner d'excellents résultats et c'est lui que nous employons toujours. Il faut avoir soin de prélever toutes les colonies qui paraissent différentes ; on doit remettre les tubes à l'étuve même après prélèvement, car certaines espèces poussent lentement, ou bien des colonies qui, au début, semblaient identiques se différencient peu à peu.

Résultats obtenus.

Par l'emploi de cette technique, nous avons obtenu des résultats intéressants.

Dans un petit nombre de cas nous avons constaté que certaines cavernes ne contenaient pas de microbes autres que le bacille de Koch ; ces cavernes avaient une paroi infiltrée de tubercules et leur cavité contenait une matière caséeuse blanc grisâtre typique. Les examens microscopiques, les cultures en milieu aérobie ou anaérobie ont montré qu'il n'y avait pas d'infection secondaire. Cette évolution pure de la tuberculose, qui se fait ordinairement ainsi dans les organes fermés comme le foie, le rein, etc., est exceptionnelle dans le poumon ; la communication avec une bronche amène bientôt l'invasion de bactéries surajoutées.

C'est en effet ce que nous avons constaté et nous pouvons diviser les faits observés en deux classes.

Dans une première classe nous avons trouvé exclusivement des microbes aérobies ou facultatifs, et voici les espèces microbiennes les plus fréquentes :

Streptocoque de la salive, Streptocoque pyogène,
Staphylocoque blanc, Staphylocoque doré,
Pseudo-méningocoque,
Bacille de Friedlander, Bacille pseudo-diphtérique,
Proteus (Une seule fois et très rare),
Sarcine (Une seule fois et très rare),
Coccus non identifié (Une seule fois et très rare).

Ces microbes ont été trouvés dans les crachats ou dans les cavernes, mais jamais dans le tissu pulmonaire ni dans le sang de la circulation générale.

On voit que, dans cette série de faits, nous n'avons observé rien qui ne soit connu, et nous n'insisterons pas. Répétons seulement qu'à notre avis, ces infections ne semblent pas imprimer une évolution spéciale à la maladie; l'aspect des cavernes, des crachats, n'offre rien qui ne soit banal. Il est bien entendu, cependant, que, dans certains cas (nous n'avons pas eu l'occasion d'en observer), ils peuvent être la cause de broncho-peumonie, de pleurésie purulente, mais ces cas sont exceptionnels, et ces microbes peuvent pulluler longtemps dans les cavernes sans causer ce genre de complication.

Nous arrivons enfin à une troisième classe de faits qui, jusqu'à présent, n'ont pas fait l'objet de recherches systématiques. En appliquant notre technique pour la culture des anaérobies, nous avons vu que l'infection par cette classe d'organismes n'était pas rare et nous avons pu isoler les espèces suivantes. Nous les énumérerons en suivant l'ordre de l'importance du rôle qu'ils jouent d'après leur abondance dans les tissus malades, leur fréquence, leur valeur pathogène.

Bac. Ramosus; *Bac. Fragilis* (variété Veillon et Zuber), *Bac. Fragilis* (variété Guillemot),
Micrococcus Fœtidus,
Streptococcobacille de Veillon et Morax ou *Bac. Ramosoïdes*,
Staphylococcus Parvulus,
Bac. Funduliformis, *Bac. Perfringens*, *Bac. Nebulosus*, *Bac. Furcosus*,
Streptococcus parvulus,
Spirillum crassum,
Vibrio tenuis.

Nous ne referons pas l'histoire de quelques-uns de ces

microbes, qui ont été décrits dans un travail antérieur (1) et qui ont été retrouvés par de nombreux auteurs dans des maladies diverses. Nous dirons cependant que le Streptococcobacille (2) (Veillon et Morax), que nous retrouvons ici, est vraisemblablement identique au Bac. Ramosoïdes de Runeberg (3) qui a eu le grand mérite de l'étudier plus complètement et surtout d'en montrer la polymorphie. Le Streptococcus parvulus est un petit coccus très fin, légèrement ovoïde, lancéolé, en diplocoque, formant de petites chaînettes souvent accolées les unes contre les autres, en amas. Il donne dans la gélose des colonies granuleuses à bords nets et lisses. Rencontré plusieurs fois par l'un de nous, par Guillemot, il est vraisemblablement identique au très fin streptocoque trouvé par Lewkowicz dans la bouche des nourrissons, par Lippmann dans des infections biliaires, par Jeannin dans des infections puerpérales.

Nous parlerons plus longuement des deux espèces suivantes, qui n'ont pas encore été décrites :

Spirillum crassum. — Cet organisme, dans le pus ou les tissus malades, se présente sous l'aspect d'un fuseau très effilé, le plus souvent incurvé, quelquefois en forme de croissant. Quand les éléments sont unis deux par deux, leurs courbures sont en sens inverses et forment ainsi un *S* italique allongé. Examiné à l'état frais, il est mobile par des mouvements de translation et de rotation. En culture, on voit des formes analogues, mais il tend à s'allonger, et le filament apparaît comme un spirille à spires peu serrées et toujours courtes.

Les éléments provenant des cultures sont extrêmement mobiles ; ils se déplacent avec une grande rapidité, souvent par un mouvement de va-et-vient en avant et en arrière ; certains éléments, qui sont immobiles, se détendent brusquement comme un ressort et se mettent rapidement en marche, pour

(1) Veillon, Sur un microcoque strictement anaérobie trouvé dans les suppurations fétides, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1893. Veillon et Zuber, Sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle dans la pathologie. *Arch. de Méd. expérim.*, juillet 1898.

(2) Veillon et Morax, Péricystite gangréneuse. *Annales d'Oculistique*, 1900.

(3) Birger Runeberg, *Studien über die bei peritonäalen Infektionen appendicularen Ursprungs vorkommenden sauerstofftoleranten sowie obligat anaeroben Bakterienformen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für die Pathogenese der artiger Peritonitiden.* Berlin, 1908.

s'arrêter bientôt non moins brusquement. Ce spirille est pourvu de cils très longs et très fins qui s'implantent aux extrémités et aussi le long du corps.

Il se colore par le violet de gentiane, et surtout par la fuchsine de Ziehl ou le Giemsa. Il ne se colore pas par la méthode de Gram. Les colonies dans la gélose ont des caractères assez



Fig. 1. — *Spirillum crassum.* Culture en gélose sucrée de 48 heures. Formes jeunes et courtes, pour montrer les cils. — Grossissement : 1800 d.

spéciaux. Au bout de quarante-huit heures de séjour à l'étuve, la colonie forme un point à peine visible à l'œil nu, mais qui apparaît au microscope comme une masse sphérique, jaunâtre, très granuleuse. En suivant le développement au microscope, la masse devient jaunâtre, mais plus foncée ; les bords lisses sont ondulés et bientôt s'estompent. La colonie, à l'œil nu, prend alors l'apparence d'une masse blanche, très finement nuageuse ; ce nuage est plus ou moins dense, cotonneux d'aspect, selon la consistance du milieu (richesse en gélose). Les cultures en bouillon sont peu abondantes ; il se forme un léger

trouble et un léger précipité au fond du liquide qui s'éclaircit. Il ne pousse qu'à la température de l'étuve. Il est peu résistant et il faut le réensemencer tous les quatre à cinq jours.

Il ne donne pas de gaz, mais les cultures sont nettement fétides.

Il est peu pathogène pour le lapin, mais donne des abcès gangreneux au cobaye sous la peau duquel on l'a inoculé, et qui succombe quelquefois.

Ce spirille, que nous avons trouvé souvent comme infection secondaire dans la tuberculose ulcéreuse, avait déjà été rencontré par l'un de nous dans le pus d'une pleurésie putride et dans la bouche. Dans l'angine de Vincent, ce qui est appelé bacille fusiforme serait constitué par deux espèces différentes: un bacille fusiforme, immobile, anaérobie, et ce spirille, dont les éléments, dans les tissus pathologiques, sont en forme de fuseaux légèrement incurvés. Nous l'avons, en effet, cultivé en partant d'angines ulcéreuses, et c'est ce qui explique la divergence des auteurs, dont les uns considèrent le bacille fusiforme de l'angine de Vincent comme mobile et les autres comme immobile.

Vibrio tenuis. — Cet organisme, dans le pus ou les tissus, se présente sous la forme d'un bâtonnet très court et extrêmement fin; une des extrémités est plus effilée que l'autre, ce qui lui donne l'aspect d'une *virgule*. Nous le répétons, il est extrêmement petit et passe très facilement inaperçu dans des préparations contenant d'autres microbes qui attirent l'attention. Dans les cultures en milieu artificiel, les éléments sont un peu plus longs; unis souvent deux à deux, ils prennent la forme d'un *S* italique et, en réalité, on voit qu'il s'agit d'un spirille très court à spire allongée. Sa mobilité est très vive, mais difficile à observer; on peut examiner pendant longtemps des préparations contenant des amas abondants de ce microbe sans qu'il semble se déplacer, mais si on concentre son attention sur un point, notamment vers la périphérie d'un amas, on voit un des éléments se détendre brusquement, comme un ressort, et se déplacer avec une grande rapidité en roulant sur lui-même; quelquefois, après quelques secondes seulement, les mouvements s'arrêtent d'un seul coup pour recommencer plus tard. Dans certaines préparations, un grand nombre d'éléments

se déplacent en même temps et on a l'image classique d'un essaim de moucherons. Toutes ces constatations sont difficiles à cause de la petitesse extrême de ce microbe.

Il ne se colore pas par la méthode de Gram.

Il se colore assez bien par les autres méthodes, fuchsine de Ziehl, liquide de Giemsa. Par la méthode de Lœffler, on constate qu'il porte à une de ses extrémités ou implanté sur le corps, du côté de sa concavité, un seul cil, long, très fin.

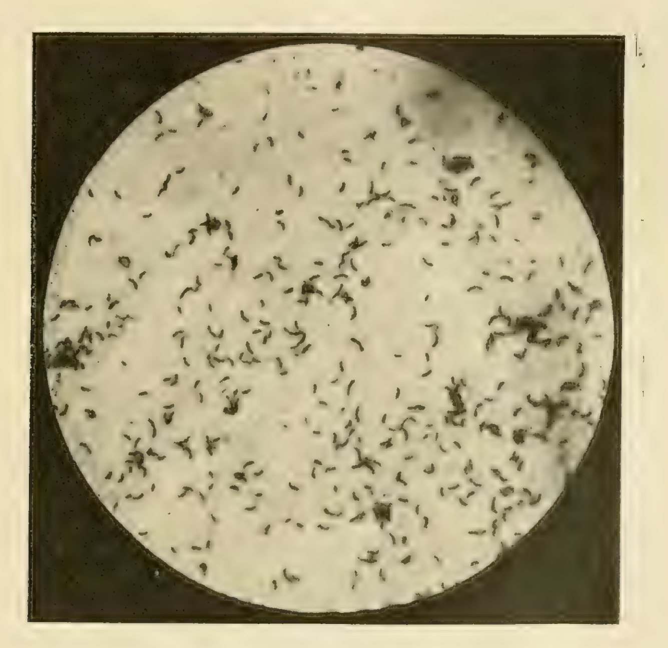


Fig. 2. — *Vibrio tenuis*. Culture en gélose de 4 jours. Éléments incurvés et en forme d'S italique. — Grossissement : 1800 d.

Il ne se développe qu'à la température de l'étuve. Les colonies, dans l'épaisseur de la gélose, apparaissent au bout de quarante-huit heures comme des points granuleux très fins; elles s'entourent d'un halo qui estompe la petite masse centrale, de sorte que, au microscope, la colonie est formée d'un noyau sombre entouré d'un nuage extrêmement fin, qui va en s'amincissant à tel point qu'on n'en peut distinguer la limite périphérique. A cette période, la colonie, à l'œil nu, apparait comme un nuage très fin, transparent, avec un point central

plus opaque. Les colonies de ce vibrion ressemblent donc à celles du *Spirillum crassum* décrit plus haut, mais elles sont plus fines, plus transparentes et plus petites. Les colonies, d'ailleurs, sont plus ou moins opaques selon que le milieu est plus ou moins chargé en gélose.

Les cultures répandent une odeur fétide, mais il n'y a pas de production apparente de gaz.

En bouillon, la culture est très pauvre ; il forme un léger nuage, à peine visible, qui se précipite.

Il est peu résistant, il faut le réensemencer tous les dix jours environ.

Il paraît très peu pathogène pour les animaux.

Ce vibrion se retrouve à l'état normal dans la bouche et, comme le *Spirillum crassum*, il pullule sur toutes les plaies de la bouche, il envahit facilement les dents cariées, les abcès dentaires ; on le trouve dans les infections bronchiques.

Ces deux organismes envahissent facilement les organes respiratoires des tuberculeux et, s'ils ne sont pas très pathogènes, ils contribuent pour une large part à donner l'odeur fétide des exsudats.

On voit que ces espèces microbiennes appartiennent pour la plupart à des espèces connues ; d'autres avaient déjà été vues, mais insuffisamment étudiées.

Nous les avons rencontrées dans les crachats, dans les cavernes, dans le tissu infiltré et enfin dans des complications plus éloignées, gangrènes pulmonaires, pleurésies. Elles nous paraissent importantes parce qu'elles impriment à l'évolution de la tuberculose des caractères spéciaux.

Les crachats muco-purulents, très abondants, sont plus liquides, plus colorés, en jaune, en brun ; la destruction des leucocytes y paraît beaucoup plus avancée et la richesse en microbes est considérable, comme dans les crachats de gangrène pulmonaire, et enfin ils sont fétides et donnent à l'haleine du malade une odeur spéciale. Le contenu des cavernes, au lieu d'avoir le caractère des matières caséeuses, est moins compact, plus coloré ; il a souvent un aspect putrilagineux et l'odeur fétide. Les parois des cavernes sont aussi modifiées : elles sont beaucoup plus déchiquetées, de couleur brunâtre.

Secoué dans l'eau, une partie du tissu putréfié s'enlève facilement et la paroi ressemble à une masse d'étoupe.

Par l'examen microscopique on constate aussi des lésions intéressantes. La matière caséeuse est constituée par un putrilage où on ne trouve plus de cellules, ni même de débris de noyaux cellulaires; en revanche on constate une véritable purée de microbes de différentes formes. Le tissu des parois caverneuses, d'aspect gris sale, nous a montré, dans les coupes colorées, trois zones : une zone sphacélée où le tissu n'a plus de texture et fourmille de microbes variés ; une zone leucocytaire où l'on voit des leucocytes dont les uns sont en voie de destruction et parmi lesquels se retrouvent encore des microbes de la zone sphacélée, mais moins nombreux ; enfin, une zone congestive, où l'on voit un état pneumonique avec de la congestion, de petites hémorragies, et çà et là des tubercules. Dans un cas la destruction gangréneuse était très avancée et, en certains points, on ne voyait que les lésions décrites plus haut, sans tubercule.

On voit donc que les crachats, le contenu de la caverne et la paroi de la caverne elle-même subissent une transformation spéciale, en relation avec la pullulation de ces microbes anaérobies; cette transformation peut se caractériser par un mot : c'est le processus putride.

Comme nous l'avons vu, ces microbes anaérobies pénètrent profondément dans le tissu de la paroi ; ils peuvent aussi pénétrer jusque dans le tissu pulmonaire sain, ou relativement sain, et y causer de petits foyers de gangrène pulmonaire, comme nous l'avons observé dans un cas. Lorsqu'une caverne est proche de la plèvre, elle peut infecter cette cavité par contiguïté, ou même s'ouvrir à son intérieur, et il se produit alors une pleurésie putride dans le pus de laquelle nous retrouvons ces mêmes espèces microbiennes, comme nous l'avons vu dans une de nos observations.

Dans presque tous les cas, la flore est riche et complexe, c'est-à-dire que les microbes sont très nombreux et appartiennent à plusieurs espèces, non seulement anaérobies, mais aussi aérobies ou facultatives ; mais la présence des anaérobies stricts existe toujours quand on constate le processus putride dont nous avons parlé plus haut.

D'autre part, l'état général paraît nettement influencé par ce genre d'infection secondaire, la fièvre hectique semble plus marquée, les malades présentent un facies un peu spécial, le teint est plombé, la peau est terreuse, il y a un peu de subictère, de la diarrhée, une faiblesse plus grande, et la terminaison fatale est plus rapide.

Pouvons-nous avoir une action sur ces infections secondaires? Il semble que la thérapeutique est bien désarmée, les médicaments internes ne nous ont donné aucun résultat; mais nous avons certainement atténué l'évolution de ce processus putride en maintenant, dans la pièce où est le malade, un récipient d'eau bouillante additionnée de teinture de benjoin : l'expectoration était plus facile et un peu moins fétide.

Conclusions.

1° Dans certains cas, très rares, les cavernes tuberculeuses ne contiennent que le bacille de Koch, sans infection secondaire.

2° Le plus souvent les cavernes tuberculeuses sont envahies par une pullulation secondaire de microbes variés.

3° Les microbes aérobies ou facultatifs forment l'infection secondaire banale, ils n'impriment pas à la maladie primitive un caractère spécial.

4° Les microbes anaérobies stricts envahissent assez souvent les cavernes tuberculeuses; ils constituent une infection secondaire intéressante, parce qu'ils impriment à la maladie des caractères spéciaux, fétidité des crachats, processus gangréneux des parois de la caverne, ou sont même la cause de complications importantes : gangrène pulmonaire, pleurésie putride, aggravation de l'état général.

5° Le processus putride et gangreneux, survenant chez les tuberculeux à la période cavitaire, est toujours sous la dépendance d'une pullulation de microbes anaérobies stricts.

ÉTUDES SUR LE PNEUMOCOQUE

IV. — AGGLUTINATION DES PNEUMOCOQUES HUMAINS ET ANIMAUX

par L. COTONI et CH. TRUCHE

Le phénomène de l'*agglutination* — tel qu'on le réalise quand on soumet une émulsion microbienne (en eau physiologique) à l'influence d'un sérum actif — *résulte* du jeu réciproque *de deux facteurs : l'agglutinabilité du microbe* et *le pouvoir agglutinant du sérum*. Aussi, pour comparer entre eux divers échantillons d'une même espèce de germes, les fait-on « défiler » devant un sérum agglutinant pris comme type et, inversement, pour comparer entre eux divers échantillons de sérums actifs sur cette espèce, les fait-on « défiler » devant un germe agglutinable pris comme étalon. Cette méthode *symétrique* rend d'incontestables services lorsque le sérum est « très fort » ou le microbe « très agglutinable », c'est-à-dire quand ils possèdent une sphère d'action ou de sensibilité fort étendue. Mais l'*individualité* parfois très accentuée des *germes* et la *spécificité* corrélative des *sérums* peuvent imposer une limite aux résultats et on se trouve alors amené à des expériences d'une extrême complexité. S'il faut faire « défiler » les microbes devant deux, trois, quatre... sérums et inversement, les recherches deviennent bientôt impraticables et, disons-le, sans intérêt aucun, puisqu'elles ne peuvent mener qu'à une conclusion prévue à l'avance, celle de l'extrême variation des germes d'une même espèce. Tel est le cas pour les pneumocoques et nos expériences nous ont montré le peu de valeur de l'agglutination dans le diagnostic des échantillons et dans celui des sérums. D'autres espèces microbiennes offrent une moindre tendance à l'individualisation de leurs représentants et, pour elles, l'agglutination constitue, dans des limites quelquefois assez étendues, un critérium dont nous ne songeons point à contester l'importance.

Notre « *matériel biologique* » se compose de : *31 échantillons de*

pneumocoques (21 pn. humains, 6 pn. du cobaye, 3 pn. du lapin, 1 pn. du cheval — déjà mentionnés dans nos publications antérieures), — de *38 sérums* d'individus atteints *d'infections pulmonaires à pneumocoques* — de *deux sérums « immuns »* (cheval et mouton) — et, naturellement, de nombreux *sérums normaux* (humains, équins, ovins). Les sérums « immuns » ont été préparés en injectant, sous la peau d'un cheval et d'un mouton, des quantités marquées de substance pneumococcique vive. Nous avons choisi, à cet effet, un échantillon devenu avirulent (dit échantillon A, dont il a été parlé dans notre premier travail). Les cultures de vingt-quatre heures en milieu T (voir ce travail) étaient centrifugées avec l'appareil de Jouan et les culots émulsionnés à l'eau physiologique. On obtenait environ 3 centigrammes de pneumocoques vivants par 10 cent. cubes de culture (1). Les détails de l'immunisation seront publiés en temps et lieu.

Pour étudier le phénomène de l'agglutination, nous nous sommes arrêtés à la *technique* suivante :

Les cultures de vingt-quatre heures, en milieu T, étaient centrifugées ; les culots pesés exactement et émulsionnés en eau physiologique, de façon à obtenir 1 milligr. 1/2 par cent. cube. On faisait agir, sur chaque cent. cube d'émulsion, des quantités variables de chaque sérum ; puis, on bouchait les tubes et on les abandonnait vingt-quatre heures à 37 degrés. On comptait comme positifs tous les cas où 1/6 de cent. cube de sérum (ou moins) agglomérait complètement 1 cent. cube d'émulsion (c'est-à-dire 1 milligr. 1/2 de germes). Ces conditions expérimentales n'ont pas été, bien entendu, décrétées *a priori* ; elles se sont montrées les meilleures à la suite de recherches d'orientation. — Ajoutons que si l'on compare, au point de vue agglutination, des cultures en milieu T et des émulsions en eau physiologique contenant la même masse de germes, on obtient dans le premier cas des résultats incontestablement moins bons. Ce qui prouve que les pneumocoques, au cours du développement, donnent naissance à des substances qui gênent leur agglomération par les sérums. De plus, ces substances varient quantitativement d'un échantillon à l'autre, d'où une absence de parallélisme frappante entre les séries d' « expériences-milieu T » et les séries d' « expériences-émulsions » correspondantes.

Nous allons rapporter, successivement, les résultats de nos études sur l'*agglutinabilité des pneumocoques* et le *pouvoir agglutinant des sérums* (*des malades*).

(1) C'est par suite d'un lapsus que, dans notre premier travail (ces *Annales*, juin 1911, p. 486), le chiffre 4 centigrammes s'est trouvé substitué à la valeur exacte : *12 centigrammes*.

Agglutinabilité des pneumocoques.

Pour apprécier le degré d'agglutinabilité de nos échantillons, nous les avons soumis tout d'abord à l'action des sérums équins et ovins normaux, puis à l'action du sérum équin « immun » et du sérum ovin « immun ».

Sérums équins normaux. — *Ils agglutinent la majorité des échantillons.* Cette propriété est-elle inhérente au sérum du cheval, ou provient-elle d'infections antérieures? Rien n'autorise à admettre la dernière hypothèse, car il semble que les affections pneumococciques et, en particulier, la pneumonie lobaire aiguë franche soient bien rares chez les équidés.

Sérum du cheval immunisé. — Un seul, parmi nos échantillons inagglutinables par le sérum normal, a été agglutiné par le sérum « immun » : rien de singulier, puisqu'il s'agit de l'échantillon A, utilisé pour l'immunisation (1). Parmi les pneumocoques déjà agglutinables par le sérum normal, les uns l'étaient davantage par le sérum « immun », les autres au même degré, d'autres moins. Fait encore plus curieux : certains échantillons se sont montrés agglutinables par le sérum normal et point du tout par le sérum « immun ». La manière dont nos expériences ont été conduites et l'identité des résultats, obtenus à plusieurs mois d'intervalle, ne sauraient laisser *aucun doute* sur l'existence de ce phénomène paradoxal.

Notons que des colonies séparées, venant d'un même malade, voire d'un même produit, peuvent se comporter d'une façon différente vis-à-vis des sérums équins, normaux et « immun ». Exemples : 2 colonies du sang sont également agglutinables par les sérums *n.* et *i.*, une colonie du pus périrénal est inagglutinable par ces sérums, — une colonie du sang est également agglutinable par les sérums *n.* et *i.*, une colonie du pus méningé n'est agglutinable que par le sérum *n.*, — une colonie du sang est également agglutinable par les sérums *n.* et *i.*, une autre n'est agglutinable que par le sérum *n.* seul. (Dans tous ces exemples, il s'agit de pneumocoques humains.

Sérums ovins normaux. — *Ils n'agglutinent qu'une faible minorité des échantillons.* (De même pour les sérums humains *normaux*, soit dit par anticipation.)

1. En rigueur, l'échantillon A se montre *légèrement* sensible au sérum normal (*infiniment plus* au « sérum A »).

Sérum du mouton immunisé. — 8 échantillons, inagglutinables par le sérum normal, ont été agglutinés par le sérum « immun » ; parmi eux, bien entendu, le pneumocoque A. Aucun des échantillons agglutinables par le sérum normal ne l'était par le sérum « immun » ; nous garantissons, ici encore, l'exactitude des expériences.

Donnons, à nouveau, des exemples montrant la façon différente dont peuvent se comporter les colonies provenant d'un même malade, voire d'un même produit (pneumocoques humains, — on a choisi *les mêmes cas que tout à l'heure.*) 2 colonies du sang ne sont agglutinables que par le sérum « immun », une colonie du pus périrénal est inagglutinable par ce sérum, — une colonie du pus méningé n'est agglutinable que par le sérum normal, une colonie du sang est inagglutinable par les sérums *n.* et *i.*, — une colonie du sang n'est agglutinable que par le sérum *i*, une autre est inagglutinable par les sérums *n.* et *i.*

Il n'existe *aucun rapport* entre la façon dont un échantillon se comporte vis-à-vis des sérums équins (normaux et « immun ») et des sérums ovins (normaux et « immun) », pas plus que vis-à-vis des sérums humains (normaux). Toutefois, un nombre assez grand de pneumocoques demeurent inagglutinables *dans tous les cas.*

Nous nous trouvons en présence de variétés individuelles qui semblent échapper à toute règle et qui n'affectent de relations ni avec l'*origine* des échantillons (homme, lapin, cobaye, cheval), ni avec leur *virulence.*

Conclusions. — Le diagnostic des pneumocoques par le critérium de l'agglutinabilité (méthode des mélanges) semble bien précaire. Il conviendra dorénavant de s'adresser au mouton (et non au cheval) pour obtenir un sérum réactif et de pousser *encore plus loin* l'immunisation. On évitera ainsi de verser dans la préparation de sérum bi- ou multivalents, laquelle, *au point de vue diagnostique*, nous paraît une véritable pétition de principe.

Pouvoir agglutinant des sérums (des malades).

Nous avons fait agir les trente-huit sérums de nos malades, recueillis à diverses périodes de l'infection (parfois avant et après la crise, dans les pneumonies franches), d'une part sur

les pneumocoques correspondants, d'autre part sur deux échantillons humains inagglutinables par les sérums normaux (équins, ovins et humains), l'un avirulent, l'autre hypervirulent pour la souris.

Action sur les pneumocoques correspondants. — Les *résultats* ont été *positifs dans un quart des cas* environ ; il s'agissait, constamment, d'échantillons inagglutinables par les sérums humains normaux. Inversement — et nous retrouvons ici encore le paradoxe déjà mentionné — certains échantillons, agglutinables par les sérums normaux, ont résisté aux sérums des malades dont ils provenaient.

Action sur les deux échantillons inagglutinables. — *Résultats nuls*, sauf pour un sérum et un échantillon (le pneumocoque hypervirulent).

Conclusions. — Le diagnostic des infections humaines à pneumocoques par la recherche du pouvoir agglutinant des sérums (méthode des mélanges) ne comporte guère de valeur pratique, *même en s'adressant aux germes homologues*. C'est d'ailleurs ce qu'admet implicitement la majorité des auteurs.

A PROPOS
DE LA NEUTRALISATION DE LA TOXINE TÉTANIQUE PAR LA SUBSTANCE CÉRÉBRALE

par A. MARIE et M. TIFFENEAU

Si l'étude de la neutralisation des toxines microbiennes par certains principes constituants de la substance cérébrale offre un grand intérêt au point de vue de la pathologie nerveuse, on sait aussi que les résultats déjà acquis sur cette question ont servi à étayer une théorie de l'immunité, celle des chaînes latérales.

A la suite de nos recherches sur la neutralisation de la toxine tétanique, le professeur Ehrlich a tiré argument des résultats que nous avions obtenus pour affirmer une fois de plus que tout concordait à faire admettre « l'identité d'action des antitoxines et des récepteurs cellulaires » (1).

La question est donc d'importance et c'est en raison de ce double intérêt, présenté par l'étude de ces phénomènes de neutralisation, que nous avions entrepris (2) de déterminer la nature des substances qui, dans les centres, neutralisent la toxine tétanique. Nos conclusions avaient été les suivantes : pour une faible portion, environ 3 p. 100, le lipoïde complexe qu'est le protagon intervient dans la neutralisation de la toxine tétanique par la matière cérébrale des mammifères, la majeure partie (97 p. 100) de ce phénomène de neutralisation étant due à une substance dont nos recherches nous avaient permis d'affirmer la nature albuminoïdique. Toutefois, nous n'étions jamais parvenus à isoler cette substance albuminoïde, même en partant de l'encéphale du cobaye, l'espèce dont la matière nerveuse a, vis-à-vis de la toxine tétanique, les propriétés les plus fortement neutralisantes.

(1) *Münch. med. Woch.*, 1909, n° 50, p. 2586.

(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 289 et 644 ; et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 657.

Dans un travail paru récemment (1), MM. Guy Laroche et Grigault, après avoir confirmé nos recherches, signalent un mode d'extraction d'un albuminoïde du cerveau humain qui jouirait du *pouvoir de neutraliser jusqu'à cinq doses mortelles de toxine tétanique*.

Nous avons tenu à répéter leurs expériences sur des encéphales de la même espèce, en suivant exactement la technique des auteurs, laquelle ne diffère guère de celle employée sans succès par nous-mêmes dans nos travaux antérieurs.

La substance cérébrale est broyée et émulsionnée dans une solution de sel marin à 10 p. 100; après vingt-quatre heures de séjour à la glacière, on filtre et le liquide est précipité par le sulfate d'ammoniaque. On centrifuge après un repos convenable de la masse, et on additionne le dépôt, préalablement dialysé, de doses variables de toxine tétanique.

Voici, dans le tableau suivant, le résumé de quelques-unes de nos expériences.

ACTION DE L'EXTRAIT DE CERVEAU HUMAIN SUR LA TOXINE TÉTANIQUE

1er Janvier 1912 (*Mélanges de 24 heures*)	9	10	11
Souris 1, reçoit sous la peau 3 cent. cubes du précipité dialysé + 0,0025 cent. cubes toxine tétanique	≡	+	
Souris 2, reçoit 3 cent. cubes du précipité + 0,001 toxine.	≡	≡	+
Souris 3, reçoit 3 cent. cubes d'eau physiologique + 0,001 toxine, soit 2 doses mortelles	≡	≡	+

3 Février 1912	4	5	6	7	8
Souris 1, reçoit sous la peau 3 cent. cubes du précipité obtenu avec un autre cerveau humain + 0,0005 cent. cubes de toxine tétanique (1 d. m.).	0	—	≡	≡	≡ —
Souris 2, reçoit 3 cent. cubes de précipité + 0,0025 cent. cubes de toxine tétanique (5 d. m.					≡ —

Comme on le voit d'après ce tableau, il ressort de nos expé-

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, p. 892.

riences que nous n'avons jamais constaté de neutralisation de la toxine tétanique par l'albuminoïde extrait du cerveau de l'homme, d'après le procédé de MM. Guy Laroche et Grigault : non seulement cette substance ne pouvait neutraliser cinq doses mortelles, mais elle s'est montrée absolument inactive même sur une dose mortelle de toxine tétanique.

Nous continuons donc à penser qu'on n'est pas encore parvenu à isoler du cerveau la substance albuminoïde à laquelle on accorde, à la suite de nos travaux, la plus grande part dans les propriétés antitétaniques de la matière nerveuse.

ERRATA

Mémoire de M. Alexandre Lebedeff

« Extraction de la zimase par simple macération ».

Page 12, ligne 1, *lire* : 0,5 cent., *au lieu de* : 5 cent.
Page 12, — 9, *lire* : 0,5 cent., *au lieu de* : 5 —
Page 24, 5e colonne, ligne 15, *lire* : 20 cent.
Page 24, 5e — ligne 16, *lire* : 2 —
Page 24, 5e — ligne 17, *lire* : 3 —
Page 24, 5e — ligne 34, *lire* : 2 —

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE MAI 1912 N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES
SUR L'HYDROLYSE COMPARÉE DU SACCHAROSE
PAR DIVERS ACIDES EN PRÉSENCE DE LA SUCRASE DE LEVURE

par M. GABRIEL BERTRAND, M. et Mme ROSENBLATT.

Il y a une trentaine d'années, en 1881, Kjeldahl fit connaître l'influence remarquable exercée par les acides sur l'action hydrolysante de la sucrase (1). Depuis, un nombre considérable d'observations ont été publiées, desquelles il résulte que presque toutes les diastases sont extraordinairement sensibles à la réaction du milieu : le plus souvent, comme dans le cas de la sucrase, l'activité diastasique s'élève en présence d'une très petite proportion d'acide, passe par un maximum, puis décroît lorsque la proportion d'acide continue d'augmenter. Il est des diastases, au contraire, pour lesquelles une réaction alcaline est plus favorable.

Sauf en ce qui concerne ces conclusions générales, les observations précitées sont loin d'être d'accord : non seulement les doses d'acides ou d'alcalis considérées comme les plus favorables varient d'un expérimentateur à un autre, même lorsqu'il s'agit d'un seul réactif pour une seule diastase, mais souvent encore, c'est tantôt la réaction acide, tantôt la réaction alcaline qui est indiquée comme accélérant l'action de la diastase en expérience.

C'est que, presque toujours, les conditions expérimentales

(1) *Meddelelser fra Carlsberg Labor.*, t. 1, p. 537.

ont été mal définies ou quelque notion importante négligée. Peu d'observateurs, par exemple, ont tenu compte de la nature de l'acidité, bien différente suivant qu'on l'apprécie avec l'hélianthine, le tournesol ou la phtaléine comme indicateur; la plupart ont négligé l'influence des sels et des autres impuretés accompagnant la diastase, etc.

Il n'y a rien d'étonnant, dans ces conditions, à ce que l'étude comparative des réactifs d'un même groupe, par exemple, des divers acides sur les réactions diastasiques, n'ait pas donné toutes les indications que l'on était en droit d'espérer. Ainsi, une des mieux conduites, celle de quelques acides sur la sucrase, par Fernbach (1), laisse surtout l'impression que chaque acide possède une influence spécifique, sans relation apparente avec ses autres propriétés.

Les considérations émises par l'un de nous (2), sur la constitution et le mode d'action des diastases, ont conduit à donner une importance fondamentale aux substances qui interviennent à titre de complémentaires actives dans les réactions diastasiques; à supposer, par conséquent, des relations qualitatives et quantitatives entre l'influence exercée par ces substances et l'ensemble de leurs propriétés générales. En ce qui concerne l'influence des acides, deux d'entre nous, ainsi que Sörensen (3), ont démontré expérimentalement, dans ces dernières années, l'existence de telles relations. Nous venons de trouver, en poursuivant nos recherches, que les doses de divers acides qui produisent l'activation optimale de la sucrase présentent entre elles des relations tout à fait comparables à celles qui existent entre les doses limites d'acides paralysant la peroxydiastase (4).

Dans ces nouvelles recherches, nous avons pris, comme source de sucrase, la levure haute de boulangerie. Cette levure, convenablement traitée, donne, ainsi qu'on le verra plus loin, une solution diastasique suffisamment active pour que la quantité de substances organiques et minérales introduite avec

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, p. 538 (1889).

(2) Gab. Bertrand, *Bull. Soc. chim.*, 3e série, t. XVII, p. 623 (1897); *Rev. gén. des Sc.*, t. XVI, p. 459 (1905); et *Revue scient.*, t. XLVII, p. 609 (1909).

(3) Gab. Bertrand, *Bull. Soc. chim.*, 4e série, t. I, p. 1120 (1907); — Gab. Bertrand et Mlle Rosenband (aujourd'hui Mme Rosenblatt), *id.*, t. V, p. 296 (1909); — Sörensen, *Trav. du Labor. de Carlsberg*, t. VIII, p. 1 (1909).

(4) *Loc. cit.*

elle dans le liquide sucré puisse être considérée comme négligeable par rapport aux doses d'acides essayées. D'autre part, pour que les proportions de saccharose hydrolysé restassent sensiblement proportionnelles aux activités diastasiques, nous avons eu le soin d'employer un grand excès de saccharose.

Nous décrirons la préparation et les caractères de la solution de sucrase qui nous a servi, avant d'entrer dans le détail de nos recherches.

Préparation de la sucrase. — 125 grammes de levure pressée ont été désagrégés entre les doigts et délayés au mortier dans un demi-litre d'alcool à 95 degrés. Après quelques minutes de contact (1), on a essoré à la trompe, dans un entonnoir en porcelaine. La masse, fortement comprimée et bien égouttée, a été triturée une seconde fois avec un demi-litre d'alcool, essorée de nouveau, délayée dans 250 cent. cubes d'éther et reversée dans l'entonnoir; enfin, après ce dernier essorage, elle a été mise à sécher dans le vide sur l'acide sulfurique.

Nous avons obtenu ainsi 35 grammes d'une poudre faiblement jaunâtre, que nous avons tenu en réserve à l'abri de la lumière, dans un flacon bien bouché.

Pour déterminer les substances solubles de cette poudre, substances parmi lesquelles se trouve la sucrase, un gramme a été trituré au mortier avec très peu d'eau (2), on a ajouté ensuite assez de liquide pour faire 200 cent. cubes; on a transvasé dans un flacon, ajouté 2 cent. cubes de toluène, bouché et mis dans une étuve à + 35 degrés. Après vingt-quatre heures, pendant lesquelles on a agité de temps en temps, on a filtré sur papier Chardin, en rejetant les premières portions, troublées par un peu de levure.

La solution, limpide et pour ainsi dire incolore, avait une réaction alcaline à l'hélianthine et à l'alizarine sulfoconjuguée, acide à la phtaléine du phénol. En opérant par comparaison avec un même volume d'eau additionnée de colorant, nous avons trouvé que 20 cent. cubes de la solution exigeaient :

2,2 c.c. de $SO^4H^2N/50$ pour être saturés en présence d'hélianthine.
1,1 c.c. du même acide pour être saturés en présence d'alizarine.
et 2,25 c.c. de NaOHN/50 pour être saturés en présence de phtaléine.

(1) Il ne faut pas prolonger trop longtemps le contact avec l'alcool, sous peine de diminuer l'activité de la préparation.

(2) L'eau qui nous a servi dans toutes nos expériences avait été redistillée dans le vide avec un appareil en verre.

D'autre part, 100 cent. cubes de cette solution ont laissé par évaporation, au bain-marie, à poids constant, 0 gr. 231 de résidu sec, dans lequel on a dosé 0 gr. 0385 de cendres. L'alcalinité de ces cendres, à l'hélianthine, a été déterminée par un titrage indirect; elle correspondait à 1, 3 cent. cubes de SO^4H^2 N/10.

Ainsi, 1 gramme de poudre diastasifère donnait :

Substances solubles dans l'eau	0 gr. 462
Alcalinité de ces substances à l'hélianthine . .	0 c.c. 44 de SO^4H^2 normal.
Alcalinité de ces substances à l'alizarine . . .	0 c.c. 22 de SO^4H^2 normal.
Acidité de ces substances à la phtaléine . . .	0 c.c. 44 de NaOH normal.
Cendres solubles dans l'eau.	0 gr. 077
Alcalinité de ces cendres à l'hélianthine. . . .	0 c.c. 26 de SO^4H^2 normal.

Pour nos expériences sur l'action favorisante des acides sur la sucrase, nous nous sommes servis d'une solution dix fois plus étendue que la précédente. Nous la préparions de la même manière, mais avec 50 milligrammes seulement de poudre de levure pour 100 cent. cubes. Cette solution était employée aussitôt filtrée, et nous la renouvellions à chaque série d'expériences. Elle était assez active pour qu'un centimètre cube, correspondant à 0 milligr. 5 de poudre ou 0 milligr. 23 de substances solubles, ajouté à 15 grammes de saccharose dissous dans 84 cent. cubes d'eau, suffit à hydrolyser en vingt-quatre heures, sans aucune addition d'acide :

A la température de + 28 degrés . .	67 milligr.	de saccharose;
A la température de + 40 degrés . .	111 —	de saccharose;
A la température de + 55 degrés . .	38 —	de saccharose,

c'est-à-dire un poids de sucre atteignant 480 fois celui des substances solubles. Bien entendu, il avait été tenu compte du faible pouvoir réducteur du sucre mis en expérience.

Cette activité, mise en regard des proportions optimales d'acides que nous allons étudier, rend tout à fait négligeables les changements de réaction apportés dans les liquides en expérience par la solution diastasique, et permet de rapporter les effets obtenus par l'addition des acides directement aux doses ajoutées.

Saccharose. — Pour obtenir des résultats comparables, nous avons dû opérer toujours avec le même sucre, aussi avons-nous mis de côté, dès le début de nos recherches, une provision

importante de saccharose cristallisé, aussi pur que nous avons pu en trouver dans le commerce (1).

Quinze grammes de ce saccharose, c'est-à-dire le poids employé dans chaque expérience, donnait avec 85 cent. cubes d'eau une solution qui exigeait, pour être saturée :

En présence d'hélianthine.	1 c.c. 5 de SO^4H^2 N/100
et en présence d'alizarine sulfoconjuguée. . .	1 c.c. 2 de SO^4H^2 N/100

Il y avait dans ces 15 grammes de sucre 0 gr. 0033 de cendres, formées surtout de sulfate de calcium dont l'alcalinité était saturée par 1,7 cent. cube de SO^4H^2 N/100, en présence d'hélianthine.

L'alcalinité de ce sucre était assez faible, on le voit, pour que nous n'ayons pas eu à en tenir compte dans nos recherches.

Acides. — A part les acides sulfoniques, que nous avons préparés, la plupart des acides utilisés dans nos expériences étaient des produits commerciaux dont nous avions simplement contrôlé la pureté. Dans quelques cas, où la pureté nous avait paru insuffisante, nous avons achevé nous-mêmes la purification.

L'acide lactique qui, en solution, est, comme on sait, un mélange en équilibre d'acide vrai et d'éther lactyllactique, mélange d'autant plus riche en acide que la solution est plus étendue, a été titré comme si, à la dilution à laquelle on l'utilisait, il ne renfermait que de l'acide seul.

Le sulfate monopotassique a été préparé seulement à l'état de dissolution, en ajoutant une molécule de sulfate neutre de potassium à une molécule d'acide sulfurique dilué. Les citrate, tartrate, malonate et succinate monopotassiques ou monosodiques ont été préparés aussi en solutions, en ajoutant un poids convenable de carbonate alcalin, préalablement titré, à la solution de l'acide et concentrant pour chasser le gaz carbonique.

Exécution des expériences. — C'est par de nombreuses séries d'expériences, effectuées avec des solutions acides dont les concentrations étaient de plus en plus voisines, que nous sommes parvenus à déterminer, à 10 p. 100 près, pour chacun des

(1) C'était un sucre de premier jet, en petits cristaux, dont le lavage à la centrifuge avait été poussé plus que de coutume.

acides ou des sels acides examinés, la dose la plus favorable à l'action de la sucrase.

L'exécution d'une série d'expériences demandait trois jours. Le premier jour, on mettait en préparation, comme il a été décrit plus haut, une solution de sucrase avec 50 milligrammes de levure tuée pour 100 cent. cubes d'eau et 1 cent. cube de toluène ; on plaçait le mélange à l'étuve pour être filtré et utilisé le lendemain matin. On préparait, d'autre part, un nombre convenable de solutions acides, titrées de manière à renfermer dans 84 cent. cubes la dose d'acide qui devait former avec 85 cent. cubes la dilution à faire agir sur la sucrase. Enfin, on prélevait sur la provision de sucre en réserve un poids correspondant au nombre de matras ; on pulvérisait ce sucre et on le répartissait dans les matras, par portions de 15 grammes. Une certaine quantité d'eau pure, les solutions acides et les matras étaient alors placés dans le thermostat, à $+28^{o}$.

Le lendemain matin, après avoir filtré la solution diastasique, on commençait le remplissage des matras. Dans le premier de ceux-ci, on ajoutait seulement 85 cent. cubes d'eau. Ce matras servait à mesurer l'action réductrice du sucre sur le réactif cupro-alcalin. Nous avons répété cette mesure à chaque série d'expériences pour nous prémunir contre les petites irrégularités de composition que présentent les différentes parties d'une masse de sucre cristallisé lorsqu'elle est tant soit peu importante : la nôtre pesait 25 kilogrammes.

Le second matras était additionné de 84 cent. cubes d'eau et de 1 cent. cube de solution diastasique. Il permettait de déterminer l'activité de la diastase seule.

Enfin, les autres matras étaient divisés par paires, chaque paire recevant 84 cent. cubes de l'une des solutions acides et, soit (matras impair) 1 cent. cube de solution diastasique, soit (matras pair) 1 cent. cube d'eau ou de solution diastasique préalablement inactivée par un chauffage de cinq minutes au bain-marie bouillant (1).

Les matras étaient préparés avec un intervalle de 25 minutes entre chaque paire ; on les additionnait de 2 cent. cubes de toluène, puis, après les avoir bouchés et bien agités, on les plaçait dans le thermostat à $+28^{o}$.

Le dosage du pouvoir réducteur avait lieu après vingt-quatre heures d'action. On le pratiquait, suivant la méthode décrite par l'un de nous (2), en opérant sur une partie aliquote du liquide, en général 10 cent. cubes, et l'on rapportait les résultats, calculés en saccharose, à la totalité du liquide, en attribuant à celui-ci la densité 1,06. L'exactitude du dosage atteignait au moins 1 p. 100.

Nous nous sommes aperçus, au cours de nos recherches, que l'activité diastasique de la poudre de levure, ou, plus exactement des substances solubles qu'on en retire, n'était pas constante, mais diminuait peu à peu avec la durée de conservation.

Heureusement pour la rigueur des résultats définitifs, des

(1) Nous n'avons pas trouvé que la solution diastasique inactivée se comportât autrement que l'eau pure.

(2) Gab. Bertrand, *Bull. Soc. chim.*, 3e série, t. XXXV, p. 1285 (1906).

expériences particulières nous ont convaincus en même temps que la dose optimale d'acide était, dans une large mesure, indépendante de l'activité diastasique. Nous avons obtenu, par exemple, avec l'acide monochloracétique et des quantités de sucrase variant de 1 à 4, les poids suivant de saccharose hydrolysé, en vingt-quatre heures et à +28° :

CONCENTRATION de l'acide.	PROPORTIONS DE SUCRASE			
	1 cent. cube.	2 cent. cubes.	3 cent. cubes.	4 cent. cubes.
—	—	—	—	—
m/1600. . . .	68	132	221	335
m/1800. . . .	71	135	225	342
m/2000. . . .	81	151	244	349
m/2200. . . .	75	148	221	335
m/2500. . . .	75	143	218	335

On voit par ces chiffres la concentration optimale d'acide est restée voisine de m/2.000.

Néanmoins, pour que nos expériences restassent aussi comparables que possible, nous avons renouvelé jusqu'à cinq fois la préparation de la poudre de levure durant l'année qui a été nécessaire à nos recherches. A en juger par le dosage des matières solubles, répété sur deux de ces nouvelles préparations, la composition de la poudre de levure est restée la même à environ 2 p. 100 près (trouvé : matières solubles, 45,8 et 44,0 p. 100). Quant à l'activité relative de la solution de sucrase, elle n'a guère varié que dans le rapport de un à un et demi.

Résultats expérimentaux. — Etant données la sensibilité et la précision de la technique dont nous nous sommes servis, nous avons toujours pu déterminer nettement la quantité optimale d'acide à 10 p. 100 près ; autrement dit, la courbe représentant les résultats d'expériences a toujours présenté une inflexion accusée pour des teneurs acides différant, en plus ou en moins, de 10 p. 100 de la concentration donnée comme la plus favorable à l'action de la sucrase. Lorsqu'on fait intervenir, pour le dosage du sucre hydrolysé, la méthode polarimétrique avec, presque fatalement, une proportion trop grande de sucrase ou trop petite de saccharose, on obtient, au contraire, des courbes à plateau plus ou moins étendu, surtout avec les acides faibles, et le degré d'approximation diminue d'autant.

Ne pouvant donner en détail les résultats de nos expériences qui ont exigé près d'un millier de dosages de sucre, nous les résumerons en un tableau.

NOMS DES ACIDES	POIDS moléculaires.	CONCENTRATION optimales.	CONCENTRATION Optimales (HCl 100).	ACTIVITÉ catalytiques (HCl 100).
Monobasiques :				
Benzène sulfonique.	158 »	m/13.000	465 »	104,4
p-Toluène sulfonique. . . .	172 »	m/12.000	430 »	»
p-Xylène sulfonique	186 »	m/12.000	430 »	»
Trichloracétique	163,5	m/12.000	430 »	75,4
Naphtalène sulfonique . . .	208 »	m/10.000	360 »	»
Dichloracétique.	129 »	m/ 6.000	215 »	27,1
Nitrique	63 »	m/ 3.500	125 »	100 »
Chlorhydrique	36,5	m/ 2.800	100 »	100 »
Monochloracétique	94,5	m/ 2.000	71,5	4,84
Formique.	46 »	m/ 400	14,3	1,53
Acétique	60 »	m/ 300	10,7	0,40
Isobutyrique	88 »	m/ 16	0,57	0,33
Lactique	90 »	m/ 15	0,53	1,07
Butyrique normal.	88 »	m/ 12	0,43	»
Propionique.	74 »	m/ 10	0,36	»
Benzoïque	122 »	Inactif à saturation m/50.		
Bibasiques :				
Sulfurique	98 »	m/ 3.600	128,5	107,2
Oxalique	90 »	m/ 500	17,9	37,14
d-Tartrique	150 »	m/ 275	9,82	»
l-Tartrique	150 »	m/ 275	9,82	»
Malonique.	104 »	m/ 90	3,21	6,16
Malique.	134 »	m/ 55	1,95	2,54
Succinique	118 »	m/ 24	0,86	1,19
Tribasiques :				
Phosphorique.	98 »	m/ 550	19,6	18,63
Arsénique.	142 »	m/ 330	11,8	14,43
Citrique.	192 »	m/ 310	11,07	5,17
Borique	62 »	m/ 4	0,14	»
Sels acides :				
Sulfate monopotassique . .	136 »	m/ 850	30,4	»
Oxalate monopotassique . .	128 »	m/ 28	1 »	»
Citrate monopotassique . .	230 »	m/ 20	0,72	»
Tartrate monosodique . . .	172 »	m/ 14	0,50	»
Phosphate monopotassique.	136 »	m/ 11	0,39	»
Malonate monosodique . . .	126 »	m/ 5,5	0,2	»
Succinate monosodique. . .	140 »	Inactif à saturation 2 m.		

La première colonne comprend les noms des composés acides examinés, divisés en quatre séries : acides monobasiques, bibasiques, tribasiques et sels acides, séries dans lesquelles les termes se succèdent d'après leur activité décroissante. C'est

seulement, en effet, comme dans le cas de la peroxydiastase (1), après cette subdivision préalable qu'il est possible de faire ressortir une relation évidente entre l'influence des acides sur la sucrase et leurs propriétés générales.

Les autres colonnes indiquent successivement les poids moléculaires des composés acides, supposés exempts d'eau de cristallisation ou d'hydratation ; les concentrations optimales, en molécules-grammes par litre, d'après les courbes que nous avons dessinées dans chaque cas ; les concentrations optimales rapportées à celle de l'acide chlorhydrique, faite égale à 100 ; enfin, pour servir de termes de comparaison, les activités catalytiques des mêmes acides vis-à-vis du saccharose, quand elles ont été déterminées d'après les expériences d'Ostwald (2).

Une constatation importante ressort immédiatement de l'examen comparatif des deux dernières colonnes de ce tableau : c'est que, dans chaque série d'acides, l'ordre décroissant est le même, qu'il s'agisse de la concentration optimale vis-à-vis de la sucrase ou de l'activité catalytique vis-à-vis du saccharose. Sur les dix-huit acides qui ont été étudiés à la fois par Ostwald et par nous, il n'y en a que trois, qui fassent exception : les acides trichloracétique, dichloracétique et lactique. En négligeant ces exceptions, on pourrait donc dire, d'une manière générale, que chaque acide d'une série conserve dans le phénomène diastasique la même place, par rapport aux autres, que lorsqu'il agit seul sur la substance hydrolysable.

Cette relation, est d'accord avec la théorie des actions diastasiques émise par l'un de nous (3), théorie d'après laquelle l'acide — sous la forme qu'il affecte dans la solution diluée — est le véritable agent actif de la catalyse ; la substance colloïdale, à laquelle on attache trop étroitement d'habitude l'idée de diastase, n'étant qu'une complémentaire activante.

Si, au lieu de comparer seulement l'ordre de classement des acides, on examine la grandeur relative de leur activité, on trouve encore, comme dans le cas de la péroxydiastase, que la

(1) *Loc. cit.*

(2) *Journ. f. prakt. chem.*, 2e série, t. XXIX, p. 385 (1884). Les résultats d'Ostwald sont rapportés aux solutions normales ; nous les avons calculés en solutions moléculaires pour faciliter la comparaison.

(3) *Loc. cit.*

proportionnalité est différente en présence et en l'absence du ferment. Tandis que, pour les acides monobasiques, par exemple, l'activité varie, en présence de la sucrase, de 464,3 (acide benzènesulfonique) à 0,57 (acide isobutyrique), elle ne varie plus, pour les mêmes acides, en l'absence de la diastase, que de 104,4 à 0,33. On dirait que la substance diastasique distend l'échelle d'activité des acides. Remarquons que cette influence est moins grande sur les acides bibasiques et devient inverse sur les acides tribasiques (1).

A la suite de recherches du plus grand intérêt sur le rôle de la concentration ionique dans le dédoublement provoqué par plusieurs diastases, Sörensen est arrivé à conclure que la concentration optimale en ions hydrogène dans l'hydrolyse du saccharose par la sucrase, est, à très peu près, indépendante du réactif acide utilisé (2). Dans les circonstances où il s'est placé, cette concentration est restée comprise, pour les acides sulfurique, phosphorique et citrique, entre $10^{-4,4}$ et $10^{-4,6}$. Si l'on tient compte des rapports qualitatifs et quantitatifs qui rattachent l'activité catalytique des acides sur le sucre à leur degré de dissociation électrolytique, on voit que nos résultats sont, dans leur allure générale, en accord avec ceux de Sörensen (3); il

(1) C'est même pourquoi le classement de tous les réactifs acides que nous avons étudiés en une seule série ne laisse presque pas apparaître de points communs avec le tableau d'Ostwald.

(2) En représentant en ions hydrogène les concentrations optimales données par Fernbach pour les acides sulfurique, oxalique, tartrique, succinique, lactique et acétique dans le cas de la sucrase d'*Aspergillus niger*, Kanitz (*Archiv ges. physiol.*, t. C, p. 547, 1903) avait déjà entrevu cette relation. Il aurait pu, il est vrai, en entrevoir aussi bien une autre, car il avait choisi dans les données numériques de Fernbach des valeurs tout à fait arbitraires, par exemple 0 gr. 1 d'acide tartrique ou d'acide lactique au lieu de 1 gramme et de 5 grammes.

Les recherches de H. Euler et Beth af Ugglas (*Zeits. physiol. Chem.*, t. LXV, p. 124, 1910), et celles de L. Michaelis et H. Davidson (*Bioch. Zeits.*, t. XXXV, p. 386, 1911) ont, au contraire, apporté une confirmation à celles de Sörensen.

(3) A propos de leurs recherches sur la destruction de la sucrase de levure par les alcalis et les acides, Hudson et Paine (*Journ. Amer. chem. Soc.*, t. XXXII, p. 774, 1910) ont fourni quelques résultats numériques d'après lesquels l'hydrolyse diastasique du sucre, à la température de 30 degrés, présenterait un optimum : avec les acides bromhydrique, chlorhydrique, sulfurique et tartrique, à la concentration de 1/2000 normale; avec les acides nitrique, phosphorique et oxalique, à la concentration de 1/1470 normale; avec l'acide acétique, de 1/1000 normale; avec l'acide borique, de 1/715 et avec l'acide citrique de 1/666.

Ces résultats, malheureusement, ne sont pas assez précis pour que l'on puisse en tirer avec certitude quelque relation générale.

n'en est plus tout à fait de même si l'on considère les exceptions que nous avons signalées et l'extraordinaire activité relative de certains acides en présence de la sucrase.

Le déplacement des acides trichloracétique et dichloracétique par rapport à l'acide chlorhydrique, quand on passe de la catalyse simple à la catalyse diastasique, ne peut être dû à des erreurs dans nos expériences; il existe presque aussi net, d'ailleurs, dans le cas de la peroxydiastase.

Quant à l'extraordinaire activité des acides placés en tête du tableau dans l'hydrolyse du saccharose par la sucrase, elle ne saurait s'expliquer non plus par des erreurs expérimentales. Et l'on ne peut guère l'expliquer davantage avec les notions physico-chimiques courantes. Lorsque Ostwald a déterminé l'activité catalytique des acides sur le sucre, il s'est servi de solutions acides normales, dans lesquelles la dissociation électrolytique n'était pas complète. Dans nos expériences, au contraire, lorsqu'il s'agit des acides placés en tête du tableau, la dilution est si grande qu'il faut considérer la dissociation électrolytique comme totale. Mais alors, les richesses en ions hydrogène doivent être proportionnelles aux quantités d'acides ajoutées, et l'on ne peut comprendre comment l'ion hydrogène provenant de l'acide benzènesulfonique ou de l'acide trichloracétique est environ 4 fois et demi plus actif que celui de l'acide chlorhydrique.

En résumé, dans le cas de la peroxydiastase, de la sucrase et, sans doute, de beaucoup d'autres ferments solubles, il semble nécessaire d'admettre qu'en présence de la substance colloïdale spécifique, de la complémentaire activante, l'activité des acides ne dépend pas seulement des ions hydrogène qui proviennent de leur dissociation électrolytique, mais encore, dans une large proportion, de la nature des radicaux ou anions auxquels cet hydrogène est attaché dans la molécule acide.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LE TYPHUS EXANTHÉMATIQUE
ENTREPRISES A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS
PENDANT L'ANNÉE 1911

(TROISIÈME MÉMOIRE)

(Suite et fin.)

IV

ANIMAUX RÉFRACTAIRES

par CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL.

En dehors des singes et du cobaye, les autres animaux paraissent réfractaires à l'inoculation du virus exanthématique. Nos expériences de 1909 et les essais négatifs nouveaux, dont l'exposé suit, semblent le démontrer.

D'autre part, dans leur mémoire déjà cité et paru au cours de la rédaction de cet article, Gaviño et Girard constatent la résistance du chien, du lapin, du porc, de la vache et de l'âne.

IMMUNITÉ NATURELLE DE LA CHÈVRE, DU MOUTON, DU CHIEN ET DE LA POULE.

Le 24 mars 1911, le sang du malade 62, hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, au 10ᵉ jour d'un typhus grave, a été inoculé à *deux bonnets chinois*, l'un 65 neuf, l'autre 81 vacciné par une atteinte antérieure et à une *chèvre*, un *mouton*, un *chien*, un *coq*. Les inoculations furent pratiquées dans la cavité péritonéale et les températures prises pendant 40 jours.

Les résultats ont été les suivants :

Bonnet 65 (témoin neuf), inoculé avec 5 cent. cubes de sang. *Incubation* 8 *jours, typhus grave de* 11 *jours*, suivi d'une longue période d'hypothermie (une semaine) (Courbe 24).

Bonnet 61 (témoin vacciné), inoculé d'une même dose de sang. *Résultat négatif.*

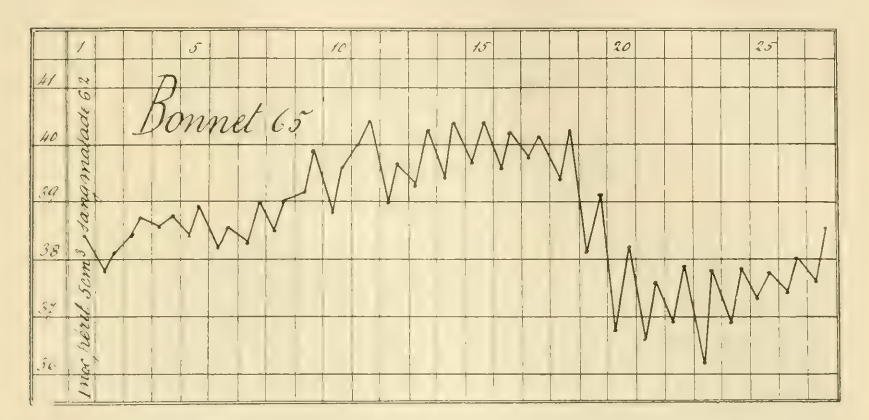
Chèvre, inoculée de 17 cent. cubes de sang. *Résultat négatif.*

Mouton, inoculé de 21 cent. cubes de sang. *Résultat négatif.*

Chien (jeune), inoculé de 10 cent. cubes. *Résultat négatif.*

Coq, inoculé de 4 cent. cubes. *Résultat négatif.*

Deux *souris blanches* et deux *rats blancs*, inoculés dans les mêmes conditions, sont morts rapidement de phénomènes toxiques.



Courbe 24.

Immunité naturelle de l'ane.

Exp. I. — *Ane* 1, inoculé, le 25 mars, dans la cavité péritonéale, avec 40 cent. cubes de sang du malade 66, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 11ᵉ jour, d'un typhus grave. Pas de singe témoin. *Résultat négatif.*

La température, prise pendant 40 jours, oscille régulièrement entre 37 et 37°5, sauf les 9ᵉ et 10ᵉ jours, où nous constatons une légère élévation : le 9ᵉ jour, matin, 38,5; soir, 38,9 ; le 10ᵉ jour : matin, 38,3 ; soir, 38.

Exp. II. — *Ane* 2, inoculé, le 21 avril, dans la cavité péritonéale avec 50 cent. cubes de sang du malade 88, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10ᵉ jour, d'un typhus grave. Témoin le *bonnet chinois* 80, qui a contracté un *typhus très grave de* 13 *jours de durée* après 6 *jours d'incubation* (Voir plus haut, Courbe 18.) *Résultat négatif.* La température a été prise pendant 40 jours.

Mis en éveil par la constatation que nous avions faite sur le cobaye 75 de la virulence de son sang en l'absence de toute réaction thermique, nous avons prélevé sur l'*âne* 2, au 9ᵉ jour après son inoculation, 7 cent. cubes de sang que nous avons inoculé dans la cavité péritonéale d'un *bonnet* neuf, le 81. Ce bonnet n'a présenté *aucune réaction* ; éprouvé, 21 jours plus tard, par l'inoculation intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang citraté du malade 120, il a contracté une infection grave de 12 jours de durée, après 12 jours d'incubation. (Voir plus haut, Courbe 12.)

Immunité naturelle du lapin.

Le 8 mai, *deux lapins* de 1.800 à 1.900 grammes sont inoculés dans la cavité péritonéale avec 4 cent. 1/2 de sang du bonnet 78 au 4ᵉ jour d'un typhus grave. Témoin, le *cobaye* 100 qui a été infecté. (Voir plus haut, Courbe 8.) *Résultat négatif.* La température a été prise pendant 40 jours.

Le 25 mai, 17 jours après l'inoculation, nous avons prélevé chez l'un de ces lapins par ponction cardiaque 6 cent. cubes de sang que nous avons inoculés dans la cavité péritonéale d'un magot neuf; *ce singe n'a pas été infecté.*

V

ESSAIS DE TRAITEMENT

par Charles NICOLLE et E. CONSEIL.

A. — Sérum de convalescents.

Nos expériences de l'an dernier prouvent l'existence, dans le sérum des malades convalescents de typhus et des singes guéris, de propriétés préventives spécifiques. Toutefois, ces propriétés ne sont appréciables que lorsque le sérum a été recueilli dans les premiers jours qui suivent la chute de la température; rapidement ensuite, elles s'amoindrissent et disparaissent.

Antérieurement à nos recherches, plusieurs médecins, en particulier Lewaschew, Legrain, Raynaud, avaient empiriquement tenté l'emploi du sérum de malades guéris pour le traitement des exanthématiques. Les résultats obtenus par eux semblaient favorables, quoique la durée de l'infection n'en parût pas sensiblement abrégée.

Au cours de nos recherches de 1910, nous avions poursuivi quelques essais analogues : sur nos singes infectés d'abord; puis, dans un cas, sur l'homme. Les effets furent assez encourageants pour nous décider à entreprendre en 1911 des essais plus étendus.

Les résultats n'ont pas répondu à notre attente. Nous nous étions placés pourtant dans les conditions les meilleures, ne faisant usage que du sérum de malades guéris depuis 5 à 8 jours (6 le plus souvent), filtré et employé à doses répétées ou massives. Dans aucun cas, la durée de l'infection n'a été manifestement abrégée. Sous l'action du médicament, l'état général semble bien dans certains cas s'améliorer, les symptômes nerveux, en particulier, paraissent perdre de leur gravité, mais le bénéfice est faible, incertain et dans tous les cas nullement en rapport avec les difficultés d'application de ce traitement : nécessité de la présence auprès des malades de convalescents

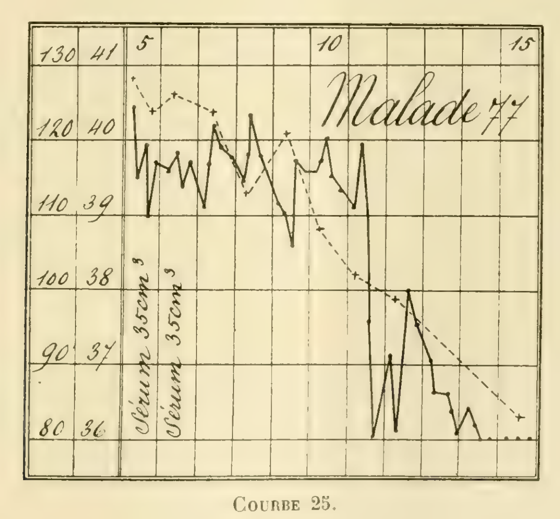
guéris depuis peu de jours, importance et danger pour ceux-ci de telles saignées, manipulations longues et délicates (filtration), etc.

On ne peut donc fonder aucun espoir sur ce mode de traitement ; tout au plus conviendrait-il à des cas exceptionnels. Pour notre part, nous déclarons y renoncer.

Voici, résumées, les observations de cinq malades ; les essais thérapeutiques tentés sur eux ont nécessité l'emploi de 685 cent. cubes de sérum, dose fournie par 15 convalescents ; soit, en moyenne, trois guéris pour un traité.

Trois mélanges de sérums ont été employés : Mélange I provenant des malades 3, 4, 5, 41, 51, 54 ayant présenté des infections graves et guéris depuis 5 et 6 jours. Mélange II : malades 57, 58, 69, 60, 63, 64 (deux infections graves, quatre légères), guéris depuis 6 et 7 jours. Mélange III : malades 55, 56, 66, guéris d'infections de moyenne gravité depuis 6 jours.

Malade 77 (Courbe 25). Indigène, 30 ans, hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, malade depuis 4 jours : fièvre, vertige, abattement, céphalée, éruption discrète, constipation, langue saburrale. Pouls, 128 ; temp., 40°4. Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes A et B négatifs, absence d'hématozoaires (mêmes résultats de ces analyses pour les malades suivants) :



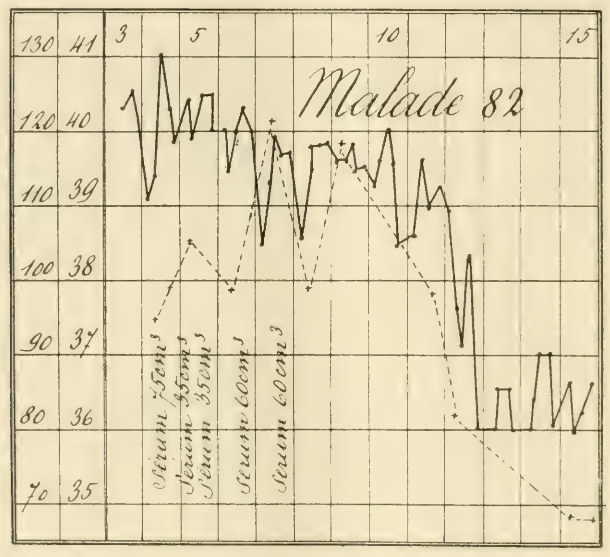
COURBE 25.

Le 31 mars, 5e jour, à 6 heures du soir, on lui injecte sous la peau 35 cent. cubes du mélange de sérums I ; le lendemain matin, même dose. Ce traitement paraît avoir eu peu d'action sur l'évolution de la maladie : la fièvre persiste, la prostration demeure semblable ; on note seulement l'absence de l'obnubilation habituelle du typhus ; le malade répond avec netteté aux questions qu'on lui pose.

La défervescence s'est produite, de façon brusque, le 7 avril. Le malade reste encore abattu quelques jours; le pouls, cependant, est meilleur que chez la plupart des convalescents et la tension artérielle demeure assez forte, malgré la complication de phénomènes d'intolérance gastrique.

En résumé : *Traitement précoce*; *dose élevée de sérum* (70 cent. cubes en 2 fois); *action nulle sur la fièvre et la durée de l'infection*; *action douteuse sur l'état général et le pouls.*

Malade 82 (Courbe 26), indigène, quinze ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 3e jour de sa maladie. Malgré une température de 40°3, il est peu abattu, cause, marche et ne se croit pas malade; il dit souffrir seulement de la tête. Dès le lendemain, l'état s'aggrave : prostation, gémissements incessants, langue saburrale, quelques taches.



COURBE 26.

Ce même jour (4 avril), 4e jour de la maladie, on lui injecte 75 cent. cubes du mélange de sérums II sous la peau et, les jours suivants, de ce même sérum : le 5 avril, matin, 35 cent. cubes; soir, 35 cent. cubes; le 6 avril, 60; le 7 avril, 60. Malgré ces injections répétées, la durée de la maladie ne paraît pas avoir été abrégée; l'état général et le pouls sont cependant un peu meilleurs que dans les cas ordinaires de typhus.

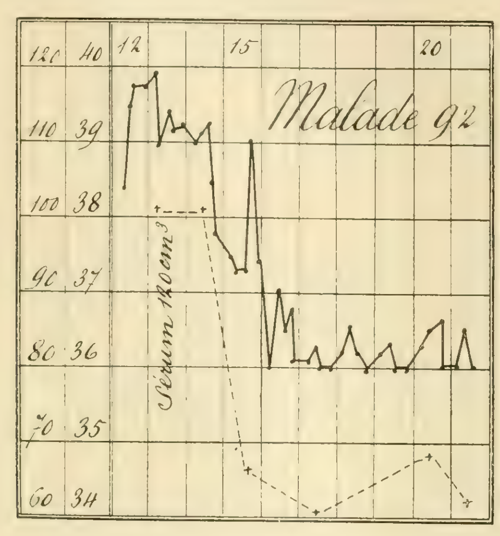
La défervescence s'est produite le 12e jour. Pendant la convalescence, le pouls se ralentit et la tension artérielle s'abaisse.

En résumé : *Traitement précoce*; *doses très élevées et répétées de sérum* (265 cent. cubes en 5 fois); *action nulle sur la fièvre*; *action douteuse sur l'état général*; *la convalescence n'a pas été meilleure que chez les malades non traités.*

Malade 92 (Courbe 27). Indigène, vingt ans, entré à la Rabta, pavillon Emile Roux, le 11e jour de son typhus, après en avoir présenté antérieurement tous

les symptômes classiques. L'éruption est en voie de disparition, mais l'état général demeure très mauvais. Des périodes de délire violent alternent avec des périodes de prostration ; le pouls seul reste assez bien frappé à 100. Le 13e jour, coma complet.

Nous lui injectons, ce jour même, 120 cent. cubes du mélange II. Le lendemain, la prostration est moindre, la malade semble se réveiller. La défervescence se produit au 15e jour; à ce moment, le pouls s'abaisse à 56 et la tension artérielle devient très faible. La convalescence a été normale.



Courbe 27.

En résumé : *Traitement tardif, dose de sérum unique, massive* (120 cent. cubes), *amélioration rapide de phénomènes nerveux graves, pas d'autre action.*

Malade 96 (Courbe 28). Indigène, vingt ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, au 8e jour de sa maladie, avec les symptômes classiques du typhus. Deux jours plus tard, on lui inocule, en une fois, sous la peau, 110 cent. cubes du mélange de sérums II. A ce moment, l'exanthème est très marqué, la langue rôtie, la céphalée extrême, l'obnubilation complète, il existe un tremblement fibrillaire des muscles; température, 40°2; pouls, 118.

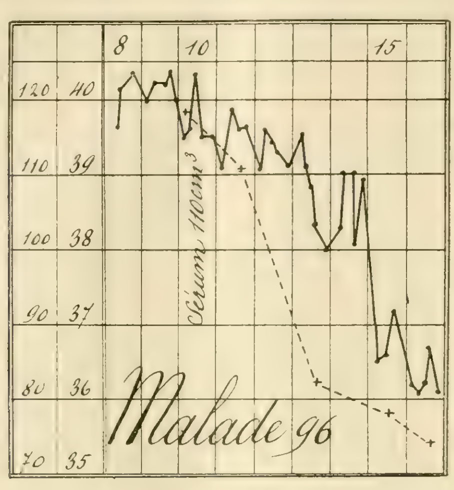
A la suite de l'injection, la température s'abaisse légèrement, la céphalée paraît s'amender, mais la maladie continue son évolution et la défervescence ne survient que le 15e jour. Convalescence normale.

En résumé : *Influence nulle d'une dose massive unique de sérum* (110 cent. cubes) *dans un cas d'intensité moyenne.*

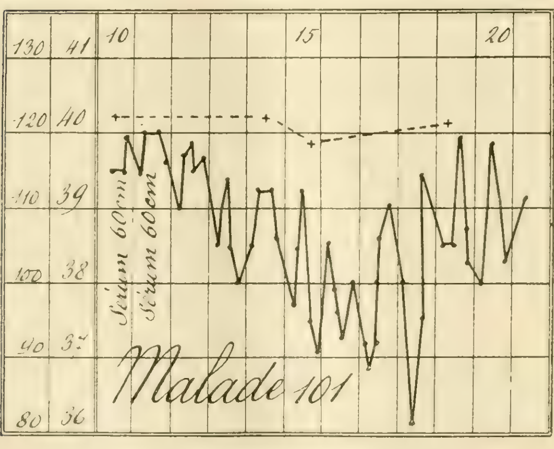
Malade 101 (Courbe 29). Indigène, vingt-cinq ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10e jour d'un typhus grave. Il présente alors un exanthème intense, du délire, une obnubilation intellectuelle complète; langue fuligineuse, engouement pulmonaire.

On lui injecte, sous la peau, le jour de l'entrée et le lendemain, 60 cent.

cubes du mélange de sérums III. Ce traitement ne modifie en rien l'état général : l'exanthème persiste ; les symptômes nerveux s'accentuent ; le regard devient fixe et, malgré une baisse momentanée de la température, le malade tombe dans le coma. La défervescence se fait en lysis du 14e au



Courbe 28.



Courbe 29.

17e jour, le pouls demeurant petit et rapide ; mais bientôt la fièvre remonte, un abcès se produit au niveau de la piqûre, et, malgré son ouverture précoce, le malade ne tarde pas à succomber.

L'autopsie ne montre qu'une congestion généralisée des viscères ; *les capsules surrénales sont normales.*

En résumé : *Influence nulle d'une dose élevée de sérum* (120 cent. cubes en 2 fois) ; *mort dans la convalescence, du fait d'une complication* (abcès).

B. — Chimiothérapie.

L'ignorance où nous sommes encore de toute connaissance certaine de l'agent pathogène du typhus devait nous engager à essayer les nouvelles médications efficaces contre les protozoaires, et à chercher, en même temps qu'une méthode thérapeutique, un renseignement sur la nature de ce microbe.

Nous avons essayé successivement le *Salvarsan* d'Ehrlich, dont l'action sur les spirilloses est si manifeste, et l'*émétique*, employé avec quelque succès pour le traitement de certains trypanosomiases.

I. Salvarsan. — Nous devons le produit essayé à l'obligeance du professeur Ehrlich, auquel nous sommes heureux d'adresser ici nos remerciements. Les ampoules portaient la marque *Op.* 129.

Quatre malades ont été traités ; tous par injection intraveineuse ; les deux premiers ont reçu le Salvarsan en solution alcaline, les deux suivants en solution acide.

Malade 56 (Courbe 30). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène quarante ans, entré au 5e jour de son infection; il vient de la prison civile où sévit alors une épidémie de typhus et présente le tableau classique des formes graves de cette maladie : courbature générale, langue saburrale, tremblements fibrillaires, exanthème typique, délire nocturne; température, 40°6. Les symptômes nerveux s'accentuent le lendemain et la fièvre demeure au-dessus de 40 degrés.

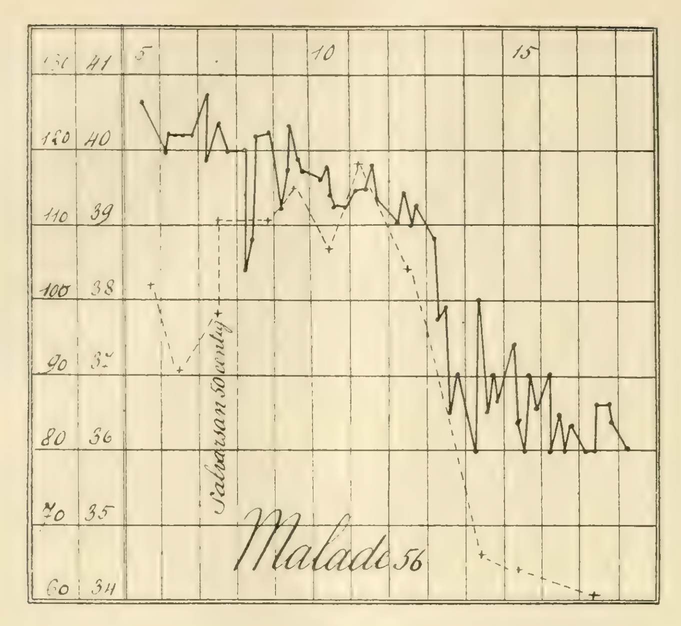
Le 7e jour au matin, nous lui injectons 50 *centigrammes* de salvarsan en solution alcaline. L'agitation persiste après l'inoculation; la température subit une baisse passagère ; le lendemain le pouls reste à 110. La maladie continue son évolution; deux jours plus tard, le malade tombe dans un état de prostration profonde qui dure jusqu'au 13e jour, c'est-à-dire exactement jusqu'à la défervescence. Convalescence rapide.

En résumé : *Résultat nul dans une forme grave traitée à la période d'état.*

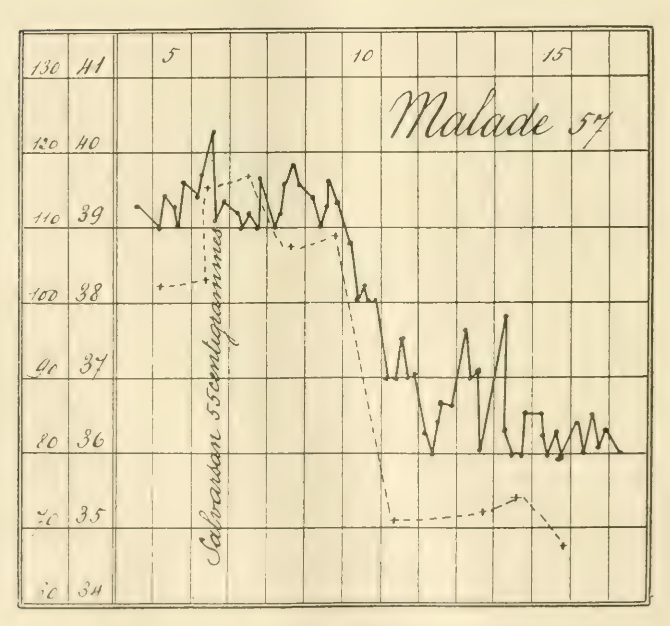
Malade 57 Courbe 31). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène, vingt-cinq ans, venant de la prison civile. Entré au 4e jour de sa maladie, en présente le tableau ordinaire; l'éruption est particulièrement marquée, les symptômes nerveux sont peu accentués.

Le 6e jour, injection de 55 *centigrammes* de salvarsan en solution alcaline. Aucune modification des symptômes, l'éruption persiste, très intense; la fièvre évolue jusqu'au 10e jour de la maladie, date à laquelle se produit la défervescence. Convalescence normale.

En résumé : *Effet nul dans une forme de gravité moyenne, traitée assez tôt.*



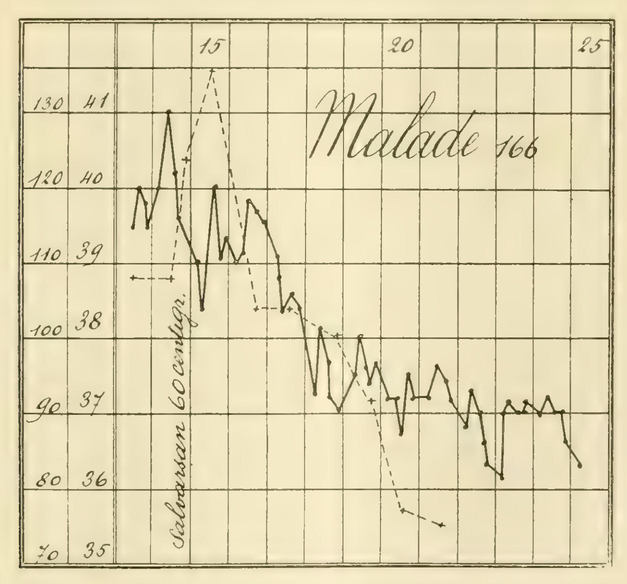
Courbe 30.



Courbe 31.

Devant ces résultats négatifs, nous avions interrompu nos essais, lorsque nous avons eu connaissance d'un travail de G. Marañon (Action del arsenobenzol en los enfermedados no sifiliticas. *Brochure*, Madrid, 1911). Trois observations de typhus exanthématique y sont rapportées, dans lesquelles la guérison serait survenue vingt-quatre heures après l'inoculation de 60 centigrammes de salvarsan. Ces résultats brillants contrastaient singulièrement avec les nôtres; c'est pourquoi nous avons repris nos essais, en employant cette fois le médicament en solution acide. L'effet en a été déplorable.

Malade 166 (Courbe 32). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène, trente ans, entré dans un état de prostration grave qui le met dans l'impossibilité de fournir alors aucun renseignement. Le tableau clinique est des plus nets : éruption, langue rôtie, soubresauts tendineux, constipation, respiration stertoreuse; temp., 40; pouls, 108.



Courbe 32.

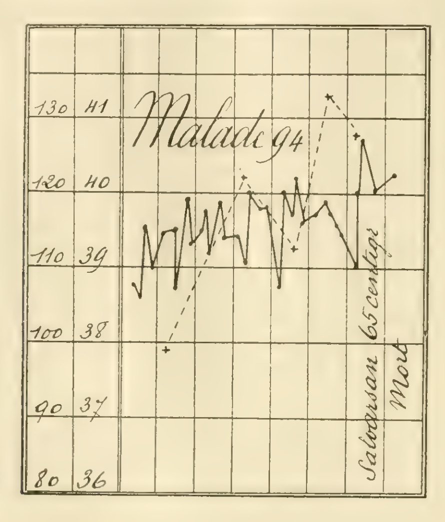
Le lendemain de l'entrée, au 14e jour de l'infection, nous lui injectons *soixante centigrammes* de salvarsan, en solution acide. Après une chute passagère de la température, la maladie reprend son évolution et les symptômes ne subissent aucune modification dans les deux jours qui suivent.

La défervescence se produit seulement au 18e jour de la maladie (trois jours après l'inoculation . Le début de la convalescence s'accompagne d'une

asthénie très marquée, qui laisse le malade pendant plusieurs jours dans un état assez critique.

En résumé : *Action nulle dans un cas grave, traité à la période d'état.*

Malade 94 (Courbe 33). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux, Indigène, trente-cinq ans, entré au 4e jour de sa maladie, tableau symptomatique grave, exanthème marqué. Après une période d'excitation violente, il tombe, le 9e jour, dans un état de prostration voisin du coma ; la température s'élève à 40°7, le pouls devient très rapide, à peine perceptible.



Courbe 33.

Devant cette hyperthermie considérable et le mauvais état général, nous nous décidons à tenter encore, malgré nos échecs précédents, une inoculation de salvarsan. La dose injectée a été de *soixante-cinq centigrammes*, en solution acide. Aucune modification de l'état général à la suite de ce traitement, la température se maintient à 40°1, le pouls devient imperceptible et le malade meurt, le lendemain matin.

A l'autopsie, on constate une congestion très intense des reins avec ecchymoses par places ; les capsules surrénales sont également congestionnées et il existe un œdème étendu autour de ces organes et des reins. La rate est très hypertrophiée (paludisme ancien) et molle ; le foie pâle et mou avec quelques ecchymoses sous-capsulaires, le cœur flasque.

En résumé : *action nulle dans une forme grave, mort*, et, à l'autopsie, existence de lésions dont une part doit être mise sans doute sur le compte du traitement.

Nos essais terminés, nous avons connu le travail de Czerno Schwartz et Holpen (*Roussky Vratch*, 12 mars 1911) qui, sur deux malades atteints de typhus, traités par le salvarsan,

eurent une mort à la suite de l'inoculation intraveineuse de 35 centigrammes du produit, en solution alcaline.

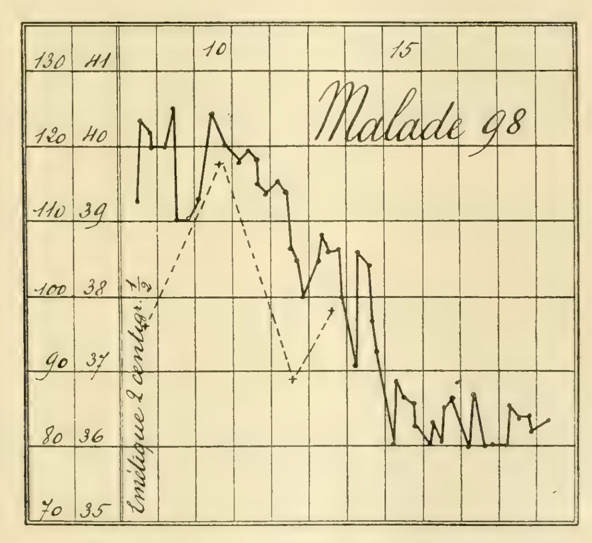
D'autre part, chez le singe infecté, Gaviño et Girard (*loco citato*) n'ont tiré aucun bénéfice de l'emploi de ce médicament.

Le salvarsan se montre donc à la fois *inefficace* et *dangereux* dans le traitement du typhus exanthématique.

II. — Émétique.

Ce médicament a été essayé sur deux malades, sous forme d'injections intraveineuses d'une solution de 1/100, suivant la technique préconisée par L. Martin et H. Darré pour le traitement de la maladie du sommeil (*Bull. de la Soc. de pathologie exotique*, 11 novembre 1908).

Malade 98 (Courbe 34). Hôpital de la Rabta, pavillon Murchison. Indigène, quarante ans, typhus d'intensité moyenne.



Courbe 34.

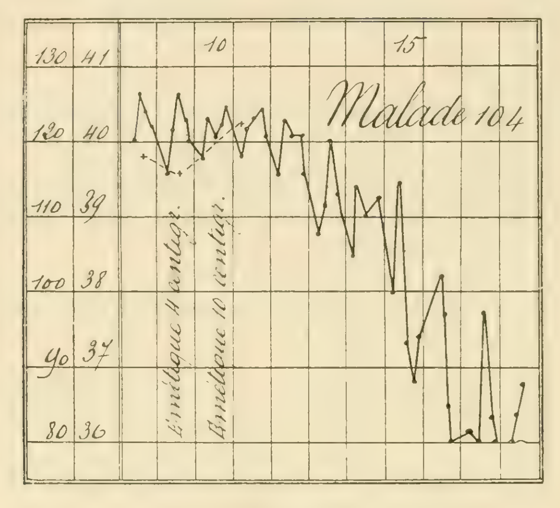
Au 8e jour de l'infection, alors que le malade présente une température de 40°4 et un exanthème très marqué, on pratique sur lui une inoculation de 25 cent. cubes de la solution, correspondant à une dose de *deux centigrammes et demi d'émétique*. La maladie continue son évolution et la défervescence se produit, en lysis, aux 14e et 15e jours.

En résumé : *résultat nul*.

Malade 104 (Courbe 35). Hôpital de la Rabta, pavillon Murchison. Indigène, vingt-cinq ans, fièvre élevée, état général assez bon.

Au 8e jour de la maladie, injection de 40 cent. cubes de la solution et, le lendemain, de 100 cent. cubes, soit au total *quatorze centigrammes d'émétique*. La maladie continue à évoluer, la chute de la température se produit au 15e jour; convalescence normale.

En résumé : *résultat nul.*



Courbe 35.

L'émétique est donc sans action sur le typhus exanthématique.

C. — Opothérapie.

Plusieurs auteurs, frappés de l'analogie que présentent certains symptômes du typhus exanthématique, dans ses formes graves, avec ceux de l'insuffisance surrénale aiguë (rapidité du pouls pendant la première période, puis abaissement de la tension sanguine et asthénie) ont cherché, sans preuves cliniques ou anatomiques, à faire du typhus une maladie des capsules surrénales ; d'autres, moins absolus, considèrent ces organes comme le lieu d'élection du virus exanthématique (Legrain, *Afrique médicale*, 1er janvier 1911 ; A. Henry, *Tunisie médicale*, 15 avril 1911 ; Fournié, *Thèse*, Alger, 1911).

Sur six autopsies de typhiques pratiquées par nous, *jamais il n'a été noté de lésions des capsules surrénales*, sauf dans un cas,

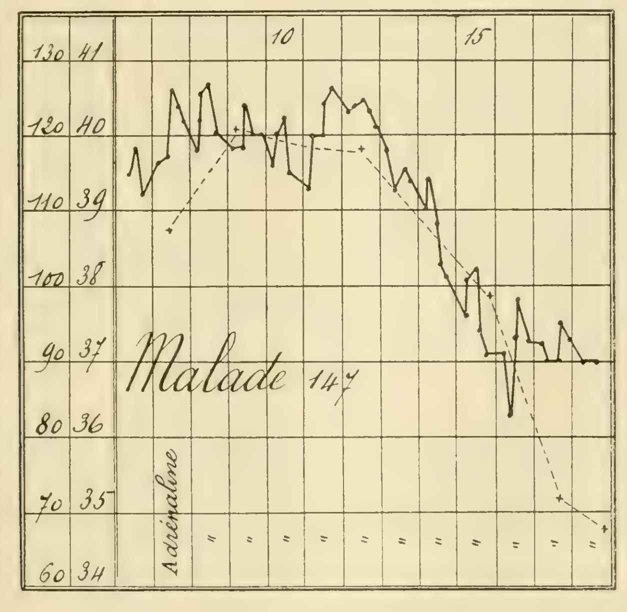
le seul où l'autopsie avait été faite tardivement. Nous sommes portés à rapporter les lésions décrites par quelques auteurs dans ces organes à des altérations cadavériques.

D'autre part, nous avons tenté sans succès le traitement par l'*adrénaline* de douze malades atteints de typhus. Voici leurs observations résumées avec quelques courbes, choisies parmi les plus typiques.

Chez les onze premiers malades, l'adrénaline a été administrée par *voie buccale*, aux doses de XV à XXX gouttes d'une solution à 1 p. 100, matin et soir; chez le douzième, nous avons employé la *voie sous-cutanée*.

Ces essais ne nous ont permis de constater aucune action manifeste du produit sur les troubles circulatoires (état du pouls), ni sur l'évolution de la convalescence.

Malade 147 (Courbe 36). Rabta, pavillon Jenner. Nègre 28 ans. Typhus grave. Traité par l'adrénaline à partir du 6e jour de la maladie. Effet nul sur l'infection. Pendant toute la durée de la convalescence, le pouls est demeuré très lent, très dépressible et un état profond d'asthénie a été noté.



Courbe 36.

Malade 179. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène 16 ans. Typhus grave. L'adrénaline a été administrée à partir du 10e jour; effet nul, mort au 14e jour. A l'autopsie, *les capsules surrénales sont normales.*

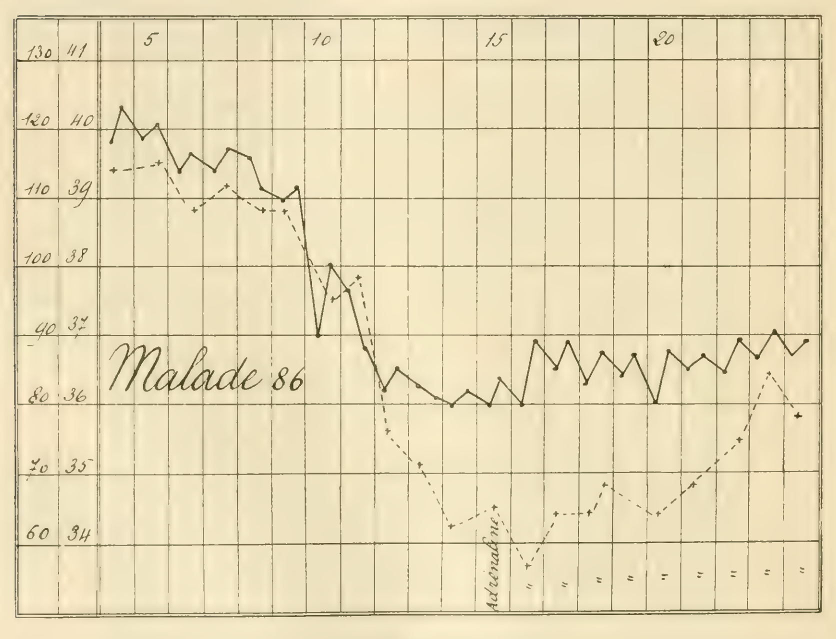
Malade 18. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans. Typhus grave

traité par l'adrénaline, à partir du 11e jour; action nulle; asthénie, faiblesse et lenteur du pouls dans la convalescence.

Malade 121. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt ans. Typhus grave (forme nerveuse), pouls à 130. L'adrénaline a été administrée à partir du 10e jour; effet nul, défervescence en lysis du 16e au 17e jour, suivie d'une chute considérable de la pression artérielle et du pouls.

Malade 139. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans. Typhus de gravité moyenne, traité par l'adrénaline à partir du 13e jour. Effet nul; état critique les premiers jours de la convalescence, asthénie, pouls lent; dépressible.

Malade 86 (Courbe 37). Rabta, pavillon Murchison. Indigène trente-cinq ans. Typhus léger; défervescence aux 10e et 11e jours. Ainsi que cela est habituel dans le typhus, le pouls est devenu lent et la pression artérielle a baissé pendant les premiers jours de la convalescence. L'adrénaline, administrée dès le début de celle-ci, n'a pas amené de modification rapide du pouls; celui-ci s'est relevé ultérieurement, ainsi que cela s'observe chez les malades non traités.



COURBE 37.

Malade 88. Rabta, pavillon Murchison. Indigène trente-cinq ans. Typhus grave. L'adrénaline a été administrée à partir du 10e jour. Effet nul, défervescence au 15e jour. Abaissement et ralentissement du pouls dans la convalescence.

Malade 93. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt-cinq ans, typhus de gravité moyenne, traité par l'adrénaline au 12e jour. Effet nul, défervescence

les 14e et 15e jours. Le pouls s'abaisse ensuite, mais la pression artérielle demeure assez bonne pendant la convalescence.

Malade 142. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt-cinq ans; typhus de gravité moyenne, éruption discrète, prostration marquée. Au 13e jour, alors que le pouls devient faible et rapide, on commence le traitement par l'adrénaline; résultat nul, le pouls demeure à 110, jusqu'au moment de la défervescence, survenue les 16e et 17e jours. A noter que, chez ce malade, on n'a pas observé l'abaissement de la pression artérielle et le ralentissement du pouls, ordinaires dans la convalescence.

Malade 143. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans; typhus grave, pouls fréquent et faible. Au 11e jour, malgré la chute de la fièvre, le pouls demeure filiforme et l'état général très mauvais (coma). On administre alors l'adrénaline sans aucun résultat; la mort survient dès le lendemain.

A l'autopsie, on constate les lésions ordinaires de congestion viscérale; *les capsules surrénales sont grosses, mais fermes et paraissent à l'œil nu normales.*

Malade 146. Rabta, pavillon Murchison. Indigène vingt-cinq ans; amené dans un état très grave (coma, exanthème intense); aucun renseignement; l'adrénaline, administrée dès l'entrée, n'amène aucune modification et la mort se produit au 4e jour de l'entrée, au milieu d'une crise d'agitation.

A l'autopsie, mêmes constatations que chez le malade précédent, *capsules surrénales normales.*

Malade 122. Rabta, pavillon Murchison. Indigène vingt-cinq ans, entré au 12e jour d'un typhus d'intensité moyenne. On lui injecte aussitôt, sous la peau, 1 cent. cube de la solution d'adrénaline Clin: ce traitement est continué pendant 8 jours. Action nulle sur l'évolution de la maladie; défervescence au 15e jour. Le pouls ne descend pas au-dessous de 88 et la tension artérielle demeure assez bonne pendant la durée de la convalescence.

L'adrénaline nous paraît d'un médiocre secours dans le traitement du typhus exanthématique; il conviendrait, en tout cas, de l'employer par voie hypodermique.

D. — Abcès de fixation.

Nous avons essayé, d'autre part, les abcès de fixation, selon la méthode de Morsly (1) et noté, dans les nombreux cas ainsi traités depuis deux ans, une mortalité plus faible et surtout une moins grande fréquence des complications secondaires. Cependant, pour juger définitivement de l'efficacité de ce traitement, il nous paraît nécessaire de s'appuyer sur une très longue statistique, que nous ne sommes pas encore en mesure de fournir.

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, octobre 1909.

La méthode ne saurait être, dans tous les cas, qu'un pis aller. L'abcès de fixation ne semble, en effet, pas agir sur l'évolution et la durée de la fièvre.

Nous devons des remerciements à M. Blanc, Secrétaire général du gouvernement tunisien, pour les facilités qu'il a données à nos recherches en confiant à l'un de nous la mission de diriger l'hôpital d'isolement de la Rabta.

VI

CONCLUSIONS

par Charles NICOLLE.

Les expériences relatées dans ce troisième mémoire apportent à la connaissance du typhus exanthématique un certain nombre de données nouvelles :

I. — Le cobaye est sensible au virus. L'inoculation péritonéale de 2 à 4 cent. cubes de sang d'homme ou de singe malades suffit à l'infecter. Une dose plus forte est toxique, souvent même mortelle, et les symptômes observés (paralysies, cachexie, mort rapide) ne diffèrent pas de ceux que provoque l'inoculation d'une quantité égale de sang humain normal.

L'incubation est variable : 7 à 16 jours. La maladie expérimentale se résume en une élévation de la température, d'une durée moyenne d'une semaine (4 à 11 jours); une perte légère de poids peut se produire à la fin de la période fébrile. Sans le secours du thermomètre, l'infection passerait inaperçue. Chez les cobayes sacrifiés et chez ceux qui meurent exceptionnellement pendant la fièvre, on ne note aucune lésion spéciale des organes.

Tous les cobayes inoculés avec une même dose du même virus ne réagissent pas.

Les passages de cobaye à cobaye sont possibles; nous en avons réalisé trois, Gavino et Girard onze.

Des passages alternatifs par cobayes et singes peuvent être

réussis indéfiniment et servir ainsi à la conservation du virus dans les laboratoires.

Le sang, chez le cobaye infecté, est virulent du début à la fin de la période fébrile; il peut également l'être à une période correspondante chez ceux des cobayes inoculés en même temps que les malades et qui n'ont pas réagi.

II. — Isolés par centrifugation et lavés, les globules blancs se montrent doués de la même virulence que la masse de sang de laquelle ils ont été extraits; séparés dans des conditions analogues, les globules rouges sont dépourvus de tout pouvoir pathogène ou immunisant. Le plasma semble ne devoir sa virulence relative qu'aux globules blancs ou débris leucocytaires, desquels il est impossible de le débarrasser entièrement.

Le sérum sanguin de coagulation provenant d'un singe infecté et privé par une centrifugation prolongée de tout élément cellulaire s'est montré non virulent pour l'homme, en inoculation intraveineuse.

Le liquide céphalorachidien, qui ne contient nul élément figuré, est inactif.

Ces divers faits plaident en faveur de l'hypothèse déjà formulée par nous du siège intraleucocytaire de l'agent inconnu du typhus exanthématique.

III. — Une inoculation de virus actif quelle qu'en soit l'origine (piqûres de poux dans nos expériences antérieures, sang dans nos expériences de l'an passé et de cette année, plasma virulent, etc.) communique aux animaux qu'il infecte une immunité rapide et durable.

L'inoculation d'un virus insuffisamment actif (sang à doses trop faibles ou chauffé, etc.) ou d'un produit lui-même avirulent provenant d'un malade (globules rouges lavés, liquide céphalo-rachidien) ne donne aucune immunité; qu'il y ait eu à la suite de l'inoculation infection avortée, comme cela peut se voir dans le premier cas, ou absence de tout symptôme, ainsi que cela se passe toujours dans le second.

Deux singes infectés, traités par l'injection d'un sérum de convalescents actif et un singe non vacciné contre une infec-

tion expérimentale ultérieure par l'injection préventive d'un sérum insuffisamment efficace, ont acquis et conservé à la suite de leur maladie expérimentale une immunité solide. Un singe, protégé efficacement contre la maladie expérimentale par l'inoculation d'un sérum de convalescents suffisamment actif, n'a pas acquis l'immunité.

La loi générale que nous formulions l'an passé conserve toute sa valeur. Seule, une infection sévère confère à coup sûr l'immunité contre le typhus exanthématique.

IV. — Le mouton, la chèvre, l'âne, le chien, le lapin, la poule sont naturellement réfractaires à l'inoculation expérimentale du virus.

V. — Le sérum de convalescents, recueilli dans les premiers jours après la défervescence, c'est-à-dire à l'époque où ses propriétés préventives sont le plus développées (Cf. nos expériences de l'an passé) ne donne aucun résultat appréciable pour le traitement de l'homme malade. Il n'agit ni sur la fièvre, ni sur le pouls; la durée et l'évolution de l'infection ne sont nullement modifiées; peut-être les symptômes nerveux et l'état général en tirent-ils un léger avantage, mais ce résultat est incertain et nullement en rapport avec les difficultés presque insurmontables qu'offre l'application de ce traitement.

Le salvarsan est inactif et dangereux; l'émétique inactif.

L'adrénaline n'empêche pas la baisse de la pression artérielle; elle se montre sans action sur la fièvre et la durée de l'infection. Il ne semble pas d'ailleurs que le virus exanthématique affecte d'une façon spéciale les capsules surrénales.

Les abcès de fixation diminuent peut-être la fréquence des complications secondaires.

RECHERCHES SUR LA TRICHINOSE (1)

par M. ROMANOVITCH

(Travail du laboratoire de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur.)

(Avec la Pl. V).

La littérature médicale est très riche en travaux sur la trichinose : des savants des plus éminents se sont attachés à l'étude de cette helminthiase ; quelques-uns de leurs travaux font époque et cependant, bien que le mémoire remarquable d'Askanazy date de 1895, on peut encore aujourd'hui répéter après cet auteur, qu'il reste encore beaucoup de points à élucider, surtout parce que ces travaux n'ont pas suffisamment porté sur le côté expérimental de la question.

Ainsi l'étude des points les plus importants : rôle des microbes dans les différents états morbides observés chez les animaux et les sujets trichinés, action toxique des larves de Trichine sur l'organisme infesté, sort des larves dans l'épaisseur même des organes parenchymateux où elles doivent nécessairement être amenées par le courant sanguin, immunité de quelques espèces animales à l'infection par la Trichine, enfin, diagnostic précoce et traitement de la maladie, manquent encore de bases expérimentales sérieuses.

C'est pour répondre à quelques-unes de ces questions que nous avons exécuté, au cours de ces deux dernières années, un grand nombre de recherches dont nous allons brièvement exposer les résultats.

Nos expériences ont porté exclusivement sur le rat et le cobaye.

(1) A. Raillet établit que le nom de *Trichinella* doit remplacer celui de *Trichine* antérieurement réservé à un genre d'insectes. La Trichine doit donc s'appeler *Trichinella spiralis* (Raillet. Quelques rectifications à la nomenclature des parasites. *Rec. de méd. vét.*, 1896, p. 161). Depuis, les parasitologistes ont admis ce terme (Blanchard. *Traité de pathologie générale* publié par Ch. Bouchard, t. II, p. 761). Par conséquent, nous devrions dire *Trichinellose* comme le propose Stäubli ; mais ce terme n'est pas encore employé assez couramment pour que nous croyions devoir délaisser l'ancienne terminologie dont nous nous sommes servis dans nos articles antérieurs.

Ponte de larves de Trichine et leur distribution dans l'organisme infesté.

Askanazy et Cerfontaine, simultanément (1891-1893), ont fait une découverte fondamentale dans l'étude de la trichinose, à savoir que les femelles de Trichine fécondées s'introduisaient, pour pondre, dans la muqueuse de leur hôte et notamment dans les vaisseaux lymphatiques. Les larves ainsi pondues dans l'intérieur même de ces vaisseaux sont ensuite entraînées par le courant lymphatique. Cette découverte a permis d'expliquer pourquoi les larves n'ont jamais été trouvées libres dans le tube digestif de l'animal infesté, sauf dans deux ou trois cas où elles ont été rencontrées en nombre insignifiant.

L'absence de larves libres dans le tube digestif de l'hôte n'empêchait cependant pas, pendant longtemps, les parasitologistes de prétendre que la femelle de Trichine fait sa ponte dans le canal même de l'intestin.

Actuellement, il est admis que les femelles de Trichines s'enfoncent dans les villosités de l'intestin, s'introduisent entièrement ou seulement par la partie antérieure de leurs corps dans l'espace lymphatique central des villosités mêmes ou bien dans les vaisseaux lymphatiques plus profonds de la muqueuse et même dans la sous-muqueuse comme Askanazy l'a observé une seule fois.

D'après Cerfontaine, la pénétration de Trichines dans la sous-muqueuse serait un fait banal.

Pour notre part, nous pouvons affirmer, en nous appuyant sur de nombreuses recherches personnelles, que la Trichine ne dépasse jamais la muscularis mucosæ.

Les dessins 1 et 2 montrent les endroits où l'on retrouve le plus souvent ces vers. Tantôt la Trichine (fig. 1) se loge dans le cul-de-sac glandulaire qu'elle dilate et distend parfois d'une façon considérable. On voit en *a* le cul-de-sac ainsi déformé perdre la plupart de ses cellules épithéliales; les cellules conservées sont atrophiées et devenues, pour la plupart, cubiques.

Très souvent on retrouve la Trichine dans l'intérieur du vaisseau lymphatique central de la villosité, comme le montre la figure 2. Le ver est représenté en *a* et *a'*. Ce dessin est caracté-

ristique. On s'y rend bien compte que le vaisseau lymphatique dilaté au niveau où loge la Trichine, reprend plus haut son calibre normal.

On comprend donc que les larves pondues par la Trichine soient facilement emportées par le courant lymphatique de la villosité vers les organes profonds.

Les cellules endothéliales du vaisseau lymphatique qui loge

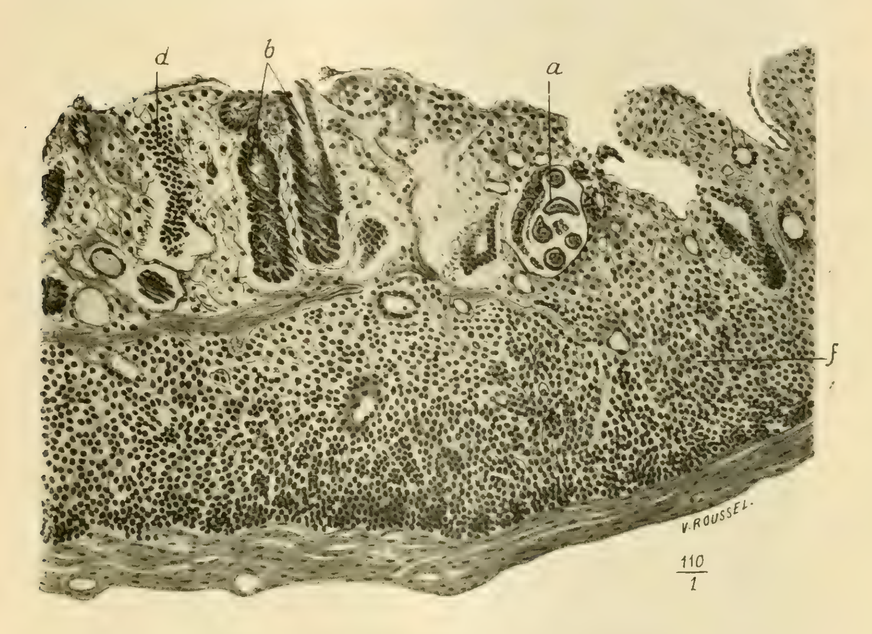


Fig. 1. — *Coupe d'intestin d'un rat trichiné.*

a) Cul-de-sac très dilaté d'une glande de Lieberkühn montrant dans son intérieur de nombreuses sections d'une Trichine adulte; *b*, *c*) glandes de Lieberkühn; *d*) capillaire lymphatique du chorion rempli de leucocytes; *f* sous-muqueuse infiltrée par des leucocytes.

le parasite souffrent de la présence de la Trichine. Elles sont souvent hypertrophiées (fig. 2, *b'*). Elles montreraient même parfois d'après Askanazy, des figures de karyokinèse, ce que nous n'avons pas trouvé dans nos préparations.

Par contre, nous avons trouvé très souvent et en grand nombre des cellules épithéliales en karyokynèse, et cela aussi bien au voisinage des vaisseaux lymphatiques parasités qu'à une certaine distance de ces derniers.

Légende de la figure 2.

Cette préparation montre très nettement la pénétration d'une femelle de Trichine (*a*, *a'*) dans le vaisseau lymphatique très dilaté (*c*.) Dans la partie profonde, ce vaisseau reprend son calibre normal (*c'*). Une glande de Lieberkühn, au voisinage du vaisseau parasité, montre un grand nombre de cellules en kariokynèse (*d*).

Fig. 2. — *Coupe d'intestin grêle d'un cobaye trichiné.*

La figure 2 montre en *d* un grand nombre de ces cellules en mitose.

Askanazy, qui a aussi constaté quelquefois, mais plutôt rarement, la karyokinèse des cellules des glandes de Liberkühn, considère ce phénomène comme normal.

Pour nous, cette multiplication des cellules épithéliales est certainement en rapport avec la destruction des cellules glandulaires et de celles de revêtement, qui est si intense dans la trichinose. Notre façon de voir est corroborée par les observations de Ziegler (1), qui a constaté que la division du noyau et de la cellule ne s'effectue pas seulement au niveau de la perte de substance, mais aussi à une certaine distance. Dans l'intestin, la perte des cellules épithéliales superficielles est compensée par la multipli-

(1) Ziegler, *Lerbuch der allgemeine Pathologie und der pathologische Anatomie.* Iena, 1901, volume I, p. 302.

cation des cellules se trouvant au fond des glandes de Lieberkühn.

Nous n'avons pas à décrire ici les lésions anatomo-pathologiques qu'on trouve dans l'intestin, au niveau de l'infection par la Trichine; disons seulement que la nécrose et la destruction en masse des cellules épithéliales de revêtement, qui provoque la multiplication de l'épithélium profond, va presque toujours de pair avec l'abrasion de la partie superficielle d'un grand nombre de glandes de Lieberkühn, avec l'hyperémie de toutes les parois ainsi qu'une infiltration inflammatoire qui ne dépasse généralement pas la sous-muqueuse.

Les larves pondues dans l'intérieur des lymphatiques suivent la voie de ces vaisseaux et gagnent ensuite le courant circulatoire. Trouvées pour la première fois dans le sang par Zenker (1), puis par Bouchard et Magnan (2), elles y ont été recherchées d'une façon systématique par Staubli (3). Pour ce dernier, les larves de Trichine apparaissent dans le sang sept jours après l'infection. Nous les y avons quelquefois trouvées dès le cinquième jour; mais en général elles apparaissent dans le sang du cobaye le sixième jour et ne le quittent guère que le vingtième. Chez le rat, elles disparaissent du sang plus tôt (le seizième jour).

Une des meilleures techniques de recherches des larves dans le sang est celle employée par Staubli. Elle consiste à recevoir le sang dans de l'eau acidulée. Nous prélevions du sang par ponction du cœur.

Nous avons aussi obtenu de bons résultats en mélangeant le sang à de l'eau distillée (à parties égales). Ce mélange est centrifugé et le culot obtenu est examiné au microscope.

En général, une goutte de culot montre 2 à 7 larves. Les larves ainsi obtenues sont parfaitement vivantes, mobiles, et ne sont nullement endommagées par les manipulations qu'on leur a fait subir.

Un certain nombre de larves ne suivent pas le courant circulatoire mais, nées dans l'épaisseur de la muqueuse, en dehors

(1) Cité par Davaine, *Traité des Entozoaires*, p. 747.

(2) *Ibidem*.

(3) Staübli, Beitrag zur Kentniss der Verbreitungsart der Trichinembryonen. *Vierteljahrsschr. d. Natur. — Gesellsch. in Zürich*, vol. L, 1905, p. 163.

des vaisseaux lymphatiques, elles peuvent gagner de proche en proche, par mouvement actif, la cavité abdominale où elles ont été trouvées par plusieurs auteurs (Leuckart, Staübli, Askanazy et nous-même). Nous avons aussi constaté leur présence dans la cavité pleurale : Leuckart les a aussi trouvées dans la cavité du péricarde.

Comment expliquer la présence de larves dans la cavité pleurale et péricardique?

L'hypothèse la plus plausible est qu'elles y viennent en traversant les vaisseaux sous-séreux où elles sont entraînées par le courant lymphatique. Nous en voyons une preuve dans l'observation d'Askanazy (1) qui a trouvé des larves sous la plèvre de l'animal infesté.

D'autre part, on peut également admettre qu'un certain nombre d'entre elles vient directement du poumon et du cœur. Amenées dans les capillaires de ces organes et ne pouvant s'y développer, elles les traversent de proche en proche jusqu'à ce qu'elles tombent dans la plèvre ou le péricarde. C'est probablement pour cette raison qu'on ne les trouve pas dans le poumon ni dans le foie.

Arrivées dans une de ces cavités séreuses, les larves de Trichine n'y trouvent pas un milieu favorable pour leur développement.

On sait que les helminthes égarés dans un endroit de l'organisme qui ne leur convient pas, périssent rapidement. Il se forme autour d'eux une paroi inflammatoire qui ne tarde pas à se calcifier, comme c'est le cas pour les Filaires (Filaria équina et Filaria labiato-papillosa).

Il en est ainsi de la Fasciola hépatica égarée dans les poumons où l'on trouve souvent, à sa place, une poche à parois fibreuses infiltrée de sels calcaires et remplie d'une bouillie couleur chocolat, dans laquelle on ne trouve parfois que quelques débris du parasite.

On peut donc supposer que les larves de Trichine étant de structure beaucoup moins compliquée que les Helminthes adultes, se dissolvent entièrement, sans laisser de traces,

(1) Askanazy, Zur Lehre von der Trichinosis. *Virchow's Archiv*, 1895, vol. CXLI, p. 54.

lorsqu'elles arrivent dans les cavités séreuses où elles ne trouvent pas les éléments nécessaires à leur nutrition.

Pour en avoir une preuve, nous avons pratiqué l'expérience suivante :

Nous avons injecté dans la cavité péritonéale d'un cobaye un grand nombre de larves parfaitement vivantes recueillies dans le péritoine, ou dans la plèvre d'autres cobayes ou bien encore isolées de leur sang.

Deux semaines après, nous n'avons pu, chez le cobaye ainsi traité, trouver de traces des larves, ni dans sa cavité péritonéale ni dans les muscles. Il est évident que toutes les larves injectées dans la cavité péritonéale se sont complètement dissoutes.

Les larves apportées par le courant sanguin dans les muscles, s'y installent définitivement et s'y développent jusqu'à ce qu'elles arrivent à l'état adulte asexuel.

Les savants allemands ont admis depuis longtemps que les larves de Trichine pénètrent à l'intérieur même des faisceaux primitifs de la fibre musculaire (Virchow, Lévin, Ehrhardt, Staübli et d'autres).

En France, depuis Chatin, en dépit des affirmations contraires de Davaine, il est très répandu que les larves en question s'arrêtent dans le tissu conjonctif interfasciculaire et que leur pénétration à l'intérieur du faisceau primitif est très rare. Durante (1), n'admettant pas cette manière de voir, fait néanmoins une concession partielle à la thèse de Chatin (2) : « La substance striée paraît être l'aliment de prédilection de la larve. Cependant la trichine peut évoluer en dehors du muscle, puisqu'on l'a retrouvée dans le tissu adipeux et dans les tendons. »

Durante a tort de faire cette concession. Si l'on trouve quelques larves dans le tissu conjonctif, il s'agit de parasites égarés. La substance striée de la fibre musculaire n'est pas seulement l'aliment de prédilection de la larve de Trichine ; elle est son aliment unique. Pour en user, la larve doit posséder la propriété spéciale de dissoudre le myoplasme du faisceau primitif.

Nous n'avons pu mettre en évidence cette propriété dans des expériences *in vitro* ; cependant, nous sommes conduits à l'admettre par des constatations histologiques. En effet, aussitôt

(1) Cornil et Ranvier, *Manuel d'Histologie pathologique*, vol. II, p. 387.
(2) Chatin, *La Trichine et la Trichinose*. Paris, 1883.

que la larve s'installe dans une fibre musculaire, on y constate une désagrégation du faisceau primitif; les stries disparaissent et laissent à leur place une masse amorphe, et cela dans des fibres où l'on ne trouve pas du tout le phénomène observé par Soudakévitch (1).

Si l'on veut avoir une preuve certaine que la larve de Trichine pénètre bien dans le faisceau primitif de la fibre musculaire et y suit son développement, il faut étudier les coupes histologiques des muscles dès le début de leur infestation par les parasites.

La planche jointe à ce travail ne laisse pas de doute sur ce point. On voit en *a* (Pl. V, fig. 1) une larve qui n'a pénétré qu'à moitié dans la fibre musculaire. La figure 2 est plus nette encore, car ici, la larve est représentée dans toute sa longueur, ayant pénétré complètement; elle y est depuis peu de temps (1), parce que la striation de la fibre est encore tout à fait intacte.

La démonstration décisive est apportée par la figure 4 qui montre des cellules musculaires coupées transversalement. On y voit que la coupe du parasite se trouve en plein myoplasme.

Infections microbiennes dans la trichinose.

La lésion qui frappe surtout à l'examen d'une coupe d'intestin d'animal infesté récemment par la Trichine est certainement, comme nous l'avons déjà dit plus haut, la perte d'épithélium de recouvrement sur une grande étendue de la muqueuse; de sorte que la porte reste grande ouverte à tous les microbes de la flore intestinale. Heureusement, bon nombre de ceux-ci sont détruits dans l'estomac et les bactéries arrivant dans la première moitié de l'intestin grêle, peut-être aussi en grande partie affaiblies, y périssent vite; la plupart d'entre elles ne sont, d'ailleurs, pas pathogènes.

S'il n'en était pas ainsi, l'infection bactérienne se produirait toujours et dès les premiers jours de l'infection.

L'idée que la Trichine favorise l'infection microbienne est déjà ancienne; déjà en 1877, Piana (2) avait émis cette hypo-

(1) Soudakévitch, Modifications des fibres musculaires dans la trichinose. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

(2) Cité par Neumann, *Maladies parasitaires non microbiennes.*

thèse. Friedreich (1) a observé, le premier, chez un malade atteint de trichinose, une série d'abcès sous-cutanés dont l'un renfermait une Trichine. Comme il a appris plus tard que cette complication n'est pas rare dans la trichinose, il a admis l'existence de pustulose et de furonculose trichinées.

D'après ce savant, les larves émigreraient des muscles pour aller se loger dans le tissu sous-cutané où elles provoqueraient la production du pus. Staübli s'oppose à cette manière de voir. Pour lui, la Trichine se trouve dans l'abcès d'une façon toute accidentelle, étant mise en liberté par une fibre musculaire détruite par la suppuration. Staübli (2) n'a pas trouvé de larves de Trichine dans les abcès profonds d'un malade qu'il soignait pour la trichinose. Par contre, il a isolé un staphylocoque du pus d'un abcès ; le sang et l'urine du même malade renfermaient un streptocoque, c'est à ce microbe qu'il attribue la formation d'abcès. Ce savant a également trouvé une infection bactérienne dans deux cas de trichinose expérimentale.

Comme les larves de la Trichine sont rejetées par cette dernière dans les vaisseaux lymphatiques de la muqueuse, il est évident qu'elles restent stériles et qu'elles ne peuvent pas porter de microbes dans les muscles. Nous en avons, en effet, cherché en vain dans les coupes sériées de muscles masticateurs, muscles de diaphragme, etc..., de rats trichinés sacrifiés à différentes périodes de l'infestation ; nous n'avons trouvé de microbes qu'une fois dans les muscles d'un rat autopsié seulement vingt-quatre heures après la mort. Si les larves ne provoquent pas d'infection microbienne, la Trichine, qui traverse la muqueuse toute souillée de microbes, les sème sur son passage. L'examen histo-bactériologique le montre nettement.

Nous avons pratiqué des ensemencements du sang de 23 rats sacrifiés à différentes périodes de l'infestation (de sept à vingt-cinq jours, une fois quarante-huit jours après l'ingestion de viande trichinée). Treize fois nous avons obtenu des colonies microbiennes. Six autres rats tués au moment de l'agonie ont donné des cultures. Il en est de même pour 7 rats trichinés morts trois à sept jours après l'infestation et autopsiés aussitôt après leur mort.

(1) Cité par Staubli, *Trichinosis*. Wiesbaden, 1909, p. 141.
(2) *Loc. cit.*, p. 141-142.

Sur dix cobayes trichinés, sept fois le sang a donné des cultures. Nous avons également obtenu des résultats positifs en ensemençant, immédiatement après la mort, le sang de 4 cobayes trichinés.

Le plus souvent, ces ensemencements ont donné des colonies de plusieurs microbes différents (Microbes isolés : coli-bacille, streptocoque, staphylocoque, un bacille aérobie mobile avec spore terminale et ovoïde, prenant le Gram et liquéfiant la gélatine, b. subtilis, b. mesentericus anaérobie facultatif (n. es.) un bacille rappelant la bactéridie charbonneuse et le b. perfringens (3 rats d'égouts), un diplocoque anaérobie ne prenant pas le Gram (cobaye).

Depuis la publication de nos notes préliminaires sur la Trichinose, nous avons pris connaissance d'un travail de H. Raebiger (1) qui, poursuivant ses recherches parallèlement aux nôtres, a abordé également la question de l'infection microbienne dans la trichinose. Ce savant a réussi à isoler du sang du cœur et des organes, dans 11 cas sur 111 rats trichinés, une bactérie du groupe paratyphique. Mais comme, d'une part, des rats, infestés par la Trichine, dont le sang était stérile, périssaient dans la même proportion que ceux atteints de septicémie et que, d'autre part, les lésions anatomo-pathologiques étaient trouvées identiques pour les deux séries de rats, Raebiger conclut que la présence de microbes dans le sang de rats trichinés est sans aucune influence sur le cours de la trichinose.

Tout en admettant que la Trichine puisse amener, surtout dans l'infection massive, des lésions intestinales et musculaires assez graves pour provoquer par elles-mêmes, sans intervention microbienne, une mort assez rapide, nous ne pouvons accepter la conclusion de ce savant. D'abord, nous ne connaissons pas la virulence exacte du microbe isolé par lui ; de plus, l'hémoculture négative n'exclut pas nécessairement une infection microbienne.

Nous restons, au contraire convaincu, en nous basant sur les recherches publiées par quelques auteurs et sur les résultats de nos propres expériences, que la fièvre, l'hypertrophie de la

(1) H. Raebiger. Untersuchungen über die Trichinenkrankheit. *Zeitsch. f. Infectionskr. der Haustiere*, 1911, vol. IX, f. 1-2, p. 144.

rate, les abcès, et, quelquefois, le décès qu'on observe chez l'homme atteint de trichinose, sont dus à des microbes envahissant l'organisme à la faveur des lésions de la muqueuse provoquées par le parasite.

Action toxique des larves de Trichine.

On a pensé depuis longtemps à l'action toxique des larves de Trichine. C'est Ehrhardt Oskar (1) qui a, le premier, nous semble-t-il, attribué la dégénérescence des faisceaux musculaires voisins de ceux envahis par la larve de Trichine, à l'action des substances toxiques élaborées par le parasite.

Metchnikoff (2) se prononce également en faveur de cette hypothèse. « Le tableau morbide (dans la trichinose) est plus compliqué que dans la gale et permet de supposer une action complémentaire des excreta de la larve dans la production de l'état fébrile et de certains phénomènes généraux. »

Pour Durante (3), ce parasite agirait à la fois et comme corps étranger et par les toxines qu'il sécrète. Il pense que « l'on peut attribuer à l'action locale des toxines sécrétées par le parasite, les phénomènes de dégénérescence (dégénérescence cireuse et désintégration granuleuse) limités à une petite étendue. Le foie, de volume normal, est presque toujours atteint d'une dégénérescence graisseuse que l'on peut attribuer au passage des toxines trichineuses, toxines très actives qui, dans les cas graves, sont susceptibles de donner naissance à de l'albuminurie ».

V. Linstow (4) croit que les convulsions, la parésie des membres et les accidents mortels, qu'on observe quelquefois dans la trichinose, sont dus à l'action toxique des larves. Babès (5) a trouvé des lésions chroniques du myocarde et du rein chez un individu infesté depuis vingt et un an par les larves de trichine.

(1) Ehrhardt (Oskar), Zur Kentniss der Muskelveränderungen bei der Trichinose der Kaninchens. *Beitrag. z. pathol. Anat. und z. allgem. Pathol.*

(2) E. Metchnikoff, *L'immunité dans les maladies infectieuses*, 1901, p. 4.

(3) *Loc. cit.*, p. 384, 388 et 402.

(4) V. Linstow, Die durch tierische Parasiten erzeugten toxischen Stoffe. *VIIIe Congrès international de médecine vétérinaire*, *Budapest*, 1905.

(5) *Centralblatt für Bakteriol.*, vol. XLII, 1908.

L. Opalka (1) cite, dans son travail sur la trichinose, 28 cas de trichinose de l'homme ; dans 10 cas, on a constaté des lésions du cœur, du foie ou des reins.

H. M. Höyberg (2) a expérimenté avec le sérum d'animaux trichinés. Injecté à des animaux neufs, ce sérum ne s'est pas montré toxique. L'auteur en tire la conclusion que le sérum d'animaux récemment infestés par la Trichine ne renferme pas de toxine.

Les expériences de Höyberg ne nous ont pas convaincu. Nous avons, en effet, très souvent constaté, à l'autopsie des animaux (rats et cobayes) morts de trichinose, la présence de lésions des reins et des capsules surrénales qui ne pourraient être toujours attribuées à l'infection bactérienne, l'ensemencement du sang sur milieux aérobies et anaérobies ayant souvent donné des résultats négatifs. D'autre part, il nous semble impossible d'expliquer, par la simple action mécanique, les lésions de fibres musculaires. Il faut donc penser à la toxicité des produits d'échange des larves de Trichine.

Ainsi donc, malgré les expériences de Höyberg, nous persistons à penser que, si les larves de Trichine sécrètent des substances toxiques, ces dernières doivent se trouver à un moment donné dans le sérum de l'animal infesté.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié d'une façon systématique la toxicité du sérum des cobayes et des rats infestés par la Trichine.

Ces recherches nous ont permis de constater que le sérum de ces animaux acquiert vraiment des propriétés toxiques et que cette toxicité peut déjà apparaître neuf jours après l'ingestion de viande trichinée ; on la retrouve jusqu'à un mois et demi après l'infestation. Ces sérums se sont montrés toxiques aussi bien pour d'autres cobayes que pour des rats ; autrement dit : ils étaient en même temps iso et hétérotoxiques.

Ces expériences portent sur le sérum de quatorze cobayes ; huit fois, le sérum s'est montré très toxique. Les sérums peu toxiques proviennent des cobayes chez lesquels on n'a trouvé

(1) L. Opalka, Beitrag zur Vorkommen der Trichinen bei Menschen. *Thèse de Berlin*, 1904.

(2) H. M. Höyberg, Bilden sich bei Trichinose toxische Stoffe. *Zeitsch. f. Tier. Med.*, vol. X, 1907, p. 1.

à l'autopsie qu'une faible infection par les larves de trichine.

Nous avons éprouvé nos sérums par des injections sous-cutanées à des cobayes et des rats neufs, à la dose de 4 et 6 centimètres cubes par kilogramme d'animal (1).

A la suite d'une seule injection, ces animaux étaient pris d'abattement, de tremblement, de bâillements (surtout les rats), de contractions incessantes des muscles masticateurs. Ils présentaient en même temps de la dyspnée, de la diarrhée et de l'amaigrissement. La mort survenait parfois rapidement, parfois au bout d'un temps assez prolongé ; dans deux cas, le lendemain ; dans un troisième cas, au bout de trois jours ; dans un quatrième, cinq jours ; dans un cinquième, six jours ; dans un sixième, onze jours ; dans un septième, au bout de vingt-cinq jours. Dans un cas, les deux cobayes, après avoir manifesté des troubles graves se sont rétablis après quelque temps.

On pouvait supposer que les phénomènes graves que l'on observe lorsqu'on injecte à des cobayes neufs du sérum de cobayes parasités sont dus, tout simplement, à la présence d'isohémolysines. Il n'en est rien ; nous avons en effet recherché des isohémolysines dans un grand nombre de sérums trichinés, mais toujours sans résultat.

Les animaux morts à la suite de l'injection du sérum toxique ont toujours présenté les mêmes lésions, que la mort survînt rapidement, ou bien au bout d'un temps plus ou moins long : hémorragie de l'intestin, surtout de l'intestin grêle ; hyperémie intense des vaisseaux de la cavité abdominale, cavités du cœur, dilatées et gorgées de sang.

Nous avons observé, en outre, chez quelques-uns de ces animaux, des pétéchies sous-péritonéales et des pointes hémorragiques dans les poumons. Les animaux qui survivent à

(1) Rappelons à ce propos les recherches de Vallardi (*Folia serologica*, 1911, pp. 879-882) sur l'isotoxicité du sérum de cobaye. On recueille le sérum après avoir fait séjourner le sang une heure à l'étuve et quatre heures à la glacière. Dans ces conditions, le sérum de cobaye n'est pas isotoxique, même injecté à la dose de 2 à 6 cent. cubes à des cobayes de 200 grammes.

M. Wassermann et F. Keysser (*Zeitschr. f. Hygiène*, 1911) mentionnent incidemment que le sérum de cobaye recueilli deux heures après la saignée de l'animal est isotoxique.

Tous ces faits ne font que confirmer l'interprétation que nous avons donnée des résultats de nos expériences : l'injection de cobayes neufs a été toujours pratiquée le lendemain de la saignée d'animaux trichinés. De plus, nous avons fait des injections sous-cutanées et non pas intraveineuses.

l'injection de sérum présentent, au bout de quelques jours, une maigreur extrême.

Nous avons déjà dit plus haut que la toxité du sérum de cobayes ou de rats trichinés est en rapport avec l'intensité de l'infestation larvaire. D'autre part, la sensibilité des animaux à ces substances toxiques est inégale, individuelle. Ainsi, il nous est arrivé quelquefois de ne tuer, avec la même dose de sérum, qu'un cobaye sur deux.

En général, le sérum n'est plus toxique six semaines après l'infestation. Une fois cependant nous avons constaté cette toxicité deux mois et demi après l'ingestion de viande trichinée.

Le sérum de rats infestés par la Trichine s'est montré également iso et hétéro-toxique. Les rats neufs injectés avec ce sérum ont présenté les mêmes symptômes que ceux décrits plus haut pour les cobayes. La mort survenait de vingt-quatre heures à vingt jours après l'injection.

L'injection préalable d'un sérum faiblement toxique peut rendre plus grave l'infestation ultérieure par la viande trichinée.

En voici un exemple :

Un rat reçoit en injection sous-cutanée 1 cent. cube 1/4 d'un sérum provenant d'un autre rat faiblement infesté par la Trichine. Il est malade pendant quelques jours, puis se remet et paraît se porter très bien.

Quelque temps après, il est nourri avec de la viande trichinée. L'ingestion de cette viande trichinée n'est suivie d'aucun trouble important. Or, quarante-quatre jours après l'injection de sérum faiblement toxique, ce rat meurt. Nous n'avons pas trouvé à son autopsie de lésions de trichinose intestinale. Par contre, son cadavre présentait toutes les lésions que nous avons décrites plus haut chez les animaux injectés avec un sérum très toxique.

Il est évident que, dans ce cas, l'action du sérum faiblement toxique, qui par lui-même n'était pas capable de provoquer la mort de l'animal, a été renforcée par l'apport d'une nouvelle toxine sécrétée par les larves provenant de l'ingestion de viande trichinée.

Nous avons pu étudier l'urine de trois cobayes trichinés. Les trois cobayes neufs injectés sous la peau avec 1 cent. cube 1/4 à 2 cent. cubes 1/2 d'urine ont succombé au bout de deux, trois et sept jours.

En résumé, le sérum d'un certain nombre de cobayes et de

rats trichinés s'est montré en injections sous-cutanées nettement iso et hétérotoxique.

Cette toxicité n'existe que dans le sérum des animaux très fortement infestés ; elle apparaît en général neuf jours après l'infection et ne dure le plus souvent que cinq à six semaines.

Les substances toxiques dues à la présence des larves sont éliminées par les reins : ainsi, dans trois cas, où l'on a pensé à éprouver la toxicité de l'urine, cette dernière a provoqué des symptômes très graves chez les cobayes auxquels elle a été injectée.

Recherches d'anticorps spécifiques dans le sérum d'animaux infestés.

Nous avons fort peu d'éléments pour faire le diagnostic précoce de la trichinose. L'éosinophilie apparaît bien vers le huitième jour après l'infestation, mais elle n'a rien de spécifique et ne peut servir d'indication que lorsqu'on a éliminé toutes les autres causes capables de la provoquer.

L'examen microscopique d'un petit morceau de muscle ne peut guère être utile que dans les cas d'infection très grave ; il ne donnera rien dans les cas moyens ni dans les cas légers dans lesquels les larves n'ont envahi que les muscles du diaphragme et du larynx.

Un renseignement de très grande importance peut être apporté par la recherche directe des larves dans le sang circulant. Pour arriver à un résultat, il est indispensable de suivre le malade aussitôt après l'ingestion de viande suspecte et de pratiquer l'examen de son sang d'une façon systématique et quotidiennement.

Nous avons indiqué plus haut la bonne technique à suivre. Chez l'homme, on pourra recueillir du sang au doigt, au lobule de l'oreille ou bien directement dans la veine du bras.

Comme les larves de Trichine élaborent des produits toxiques, nous nous sommes demandé si l'animal infesté réagit à la résorption de ces toxines par l'élaboration d'anticorps spécifiques. S'il en était ainsi, il serait facile d'utiliser la recherche de ces anticorps pour le diagnostic de la trichinose.

Nous avons recherché la présence d'anticorps spécifiques

dans le sérum d'animaux trichinés par la méthode de fixation du complément, ainsi que par celle des précipitines.

Comme antigène, nous avons utilisé l'extrait aqueux de muscles farcis de larves. Les morceaux de muscles broyés dans l'appareil Latapie sont triturés dans un mortier avec du verre pilé et une petite quantité d'eau physiologique. Le produit de broyage est placé pendant deux heures à l'étuve à 37 degré, puis à la glacière jusqu'au lendemain. On passe ensuite à travers une toile fine et on filtre sur du papier Chardin.

Nos recherches ont porté sur le sérum de trois rats et trois cobayes, infestés depuis huit à quinze jours. La précipito-réaction ainsi que la déviation du complément ont donné des résultats négatifs. Et cependant, dans nos expériences de fixation du complément, nous avons employé notre antigène à la dose de 0,1, 0,2. cent. cube, alors que 0,4 d'antigène fixaient par eux-mêmes le complément.

Ströbel (1), qui a également recherché des anticorps dans la trichinose, prétend avoir obtenu des résultats satisfaisants en opérant avec le sérum d'animaux et d'hommes infestés depuis plusieurs mois.

Il a préparé son antigène en traitant du muscle trichiné par une solution forte de soude caustique et d'antiformine.

En expérimentant ainsi avec les sérums humains, il a obtenu une fixation nette avec 0,3 cent. cubes d'antigène, alors que 0,4 cent. cubes fixaient seuls le complément. D'autre part, les sérums de lapin ont donné des résultats très variables. Nous ne pouvons donc accepter les conclusions de Ströbel qu'avec une grande réserve.

Quelques espèces animales, comme le cheval, le bœuf, le mouton et les oiseaux, présentent une certaine immunité naturelle contre l'infestation par les larves de Trichine. Si on les force à avaler de la viande trichinée, on constate que les larves de Trichine se développent bien dans leur intestin et y atteignent leur maturité sexuelle; et cependant, on ne trouve pas chez ces animaux d'infestation musculaire.

On s'est démandé, s'il était possible de conférer aux animaux cette résistance à l'infection par les larves de trichine, par une

(1) Ströbel, Die Serodiagnostik der Trichinosis. *Münch. med. Wochens.*, 1911, 13, p. 672.

infestation préalable. Cependant, les observations de Rupprecht (1) et d'autres, chez l'homme, des recherches expérimentales d'Askanazy et de Staübli ont démontré que les animaux guéris de trichinose peuvent subir une réinfection.

Nous avons observé des cas de réinfection spontanée chez dix rats blancs. Ces derniers étaient gardés dans des bocaux avec d'autres rats trichinés; ils se sont réinfectés en dévorant leurs compagnons morts dans la nuit. La réinfection était si intense que les rats mouraient trois ou quatre jours après le repas infestant. Une partie des animaux se sont réinfectés trente jours après l'infestation; une autre partie au bout de deux mois.

Nous avons aussi fait quelques recherches sur le traitement de la trichinose. Les médicaments antihelminthiques sont incapables de débarrasser l'intestin des femelles de Trichine fécondées, et cela pour la simple raison que ces dernières sont logées dans l'épaisseur même de la paroi intestinale. Nous avons pensé qu'il serait peut-être possible d'agir sur les embryons au moment où ils ont pénétré dans le courant circulatoire. Nous avons essayé l'effet de l'émétique et du 606.

Staübli avait fait aussi quelques essais avec l'atoxyl et l'arsacétine. La plupart des animaux traités avec ces produits sont morts au bout de quinze à trente jours. Cet auteur a remarqué un certain ralentissement dans le développement des embryons.

Pour la première série de nos expériences, nous avons préparé une solution d'émétique à 1/500. Des cobayes infestés le 25 mai ont été traités par une série d'injections (le 3, le 5, le 6, le 7, le 8, le 10, le 12, le 18 et le 25 juin); à chaque injection, ils recevaient dans la peau 0,02 d'émétique par kilogramme de leur poids.

Pas un des cobayes traités n'a évité l'infection musculaire. Chez tous, nous avons retrouvé des larves, soit dans les muscles, soit dans le sang. Il faut cependant remarquer que nous n'avons pas trouvé de larves enkystées dans les muscles d'un cobaye mort trente-trois jours après l'infestation, et que très peu de larves commençaient à s'enrouler. Un cobaye a survécu; sacrifié trois mois après le traitement par l'émétique, il a montré des larves enkystées.

Cinq rats nourris de viande trichinée, le 7 juillet, ont reçu sept injections sous-cutanées d'émétique (1,5 milligrammes par injection), du 12 au 20 juillet.

(1) Cité par Staübli.

Deux rats sont morts le 24 juillet, avec de la trichinose musculaire ; par contre, nous n'avons pas trouvé de larves de Trichine ni dans le diaphragme, ni dans les muscles masticateurs chez le cinquième rat mort dix jours après l'infestation.

Nous avons également traité cinq cobayes avec du 606 que le professeur Ehrlich a eu l'extrême obligeance d'envoyer à M. Weinberg. Les cobayes ont été injectés quatre fois en l'espace de huit jours, à raison de 0,02 à 0,04 par kilogramme de leur poids. Tous ces animaux sont morts ou ont été sacrifiés neuf à seize jours après l'infestation. Leurs muscles étaient déjà envahis.

En résumé, nous n'avons réussi, dans nos essais de traitement, qu'à ralentir quelquefois le développement de la larve de Trichine.

Notons que des abcès et des escarres produits par des injections sous-cutanées d'émétique ou de 606 rendent difficile l'administration prolongée de ces produits.

Conclusions.

I. — La femelle de Trichine pénètre dans l'épaisseur de la paroi intestinale ; elle s'arrête ordinairement dans le chorion de la muqueuse et ne dépasse pas la muscularis mucosæ. Contrairement aux assertions de Cerfontaine, elle n'atteint pas les ganglions mésentériques.

La femelle pond ses larves, soit dans les vaisseaux lymphatiques, soit dans leur voisinage. Les larves suivent la voie lymphatique pour gagner le courant circulatoire. Il serait donc utile, dans le cas d'ingestion de viande suspecte, de pratiquer l'examen quotidien du sang. On pourrait ainsi dépister la trichinose dès le début de son évolution.

II. — Les cellules épithéliales des glandes de Lieberkühn montrent souvent de nombreuses figures de karyokinèse, aussi bien au voisinage immédiat des vaisseaux lymphatiques envahis par la Trichine qu'à une certaine distance de ceux-ci.

III. — Les larves peuvent gagner la cavité séreuse (péritoine, plèvre, péricarde), mais elles y périssent très rapidement.

IV. — Il faut accepter comme définitivement démontrée la pénétration de la larve de Trichine dans l'épaisseur de la fibre musculaire primitive. Il est incontestable que la larve s'introduit dans la cellule musculaire, parce qu'elle y trouve, mieux

que partout ailleurs, les éléments nutritifs dont elle a besoin pour son développement.

V. — En traversant la muqueuse intestinale, la Trichine, toute souillée de microbes, les sème sur son passage.

Comme le montre l'étude bactériologique du sang de l'homme et des animaux infestés, le caractère dominant des infections dues à la Trichine est d'être polymicrobiennes.

Il est difficile de nier que la fièvre, les abcès et la septicémie mortelle qu'on observe quelquefois chez l'homme ne soient dus à des microbes inoculés par la Trichine.

VI. — Le sérum d'animaux (rats, cobayes) infestés par la Trichine acquiert des propriétés toxiques; ces dernières peuvent apparaître déjà neuf jours après l'ingestion de viande trichinée; elles peuvent se manifester jusqu'à un mois après l'infestation. Ces sérums sont toxiques aussi bien pour le cobaye que pour le rat: c'est-à-dire qu'ils sont en même temps iso et hétérotoxiques. La toxicité du sérum de cobaye infesté est en rapport avec l'intensité de l'infestation larvaire. La sensibilité des animaux à ces substances toxiques est inégale, sujette à des variations individuelles.

Les animaux qui survivent à l'injection de sérum toxique présentent au bout de quelques jours une maigreur extrême.

L'urine des animaux fortement infestés peut aussi devenir toxique.

VII. — La recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum d'animaux trichinés n'a pas donné de résultats satisfaisants, ni par la méthode des précipitines, ni par celle de la fixation du complément. Dans ces expériences, on a employé comme antigène l'extrait aqueux de muscles farcis de larves.

VIII. — Les cas de réinfection spontanée observés par nous confirment les expériences de Rupprecht, d'Askanazy et autres qui ont montré l'impossibilité d'immuniser les animaux contre une nouvelle infestation.

IX. — Il n'existe pas de traitement préventif ou abortif de la trichinose. On peut quelquefois ralentir l'évolution de cette helminthiase par des injections d'émétique. Le 606 d'Ehrlich ne paraît exercer aucune action sur les larves de Trichine.

EXPLICATION DE LA PLANCHE V

Ces dessins montrent la pénétration de la larve de Trichine dans l'épaisseur de la fibre musculaire primitive.

1. — La larve a pénétré à moitié dans la fibre primitive (*a*);

2. — (*a*) On voit la larve dans toute sans longueur au centre même d'une fibre primitive encore tout à fait intacte.

3. — (*a*) Larve de Trichine; (*b*) petite cavité résultant d'un défaut de substance musculaire.

4. — On a en a, a', a'' la coupe transversale de larve ayant pénétré dan l'épaisseur de la fibre primitive.

5. — *a*) Larve; *c*) substance musculaire en désagrégation au voisinage du myoplasme resté encore intact et gardant encore toute sa striation.

6. — On voit en *c* dans une fibre parasitée (*a*), et ayant perdu sa structure normale, un petit îlot de myoplasme gardant encore sa striation et muni de plusieurs noyaux.

RECHERCHES SUR LES POISONS PRODUITS PAR L'ASPERGILLUS FUMIGATUS

par E. BODIN et C. LENORMAND,
Professeurs à l'École de médecine de Rennes.

L'un de nous a signalé dans les cultures d'*A. fumigatus* l'existence d'un poison qui a été, provisoirement et sous toutes réserves, désigné sous le nom de toxine (1). Les recherches publiées alors n'ont porté que sur le liquide de culture du champignon, aussi ce premier mémoire comprend-il seulement la description des symptômes que l'injection du liquide toxique détermine chez certains animaux, et quelques indications sur les conditions dans lesquelles la toxicité apparaît dans les cultures.

Depuis, nous avons continué l'étude de cette question qui nous est apparue de plus en plus complexe et ce sont les faits que nous avons observés que nous voulons résumer ici. Si incomplets qu'ils soient, ils nous ont paru intéressants à publier : au cours de ces dernières années, en effet, des travaux remarquables ont attiré l'attention sur les substances toxiques élaborées par les champignons pathogènes et sur les modifications que les mycoses peuvent déterminer dans les humeurs de l'organisme et qui sont très analogues à celles que l'on observe dans les maladies bactériennes.

Parmi ces travaux, citons ceux de Bruno Bloch et de R. Massini (2), après ceux de M. Truffi (3) sur les Trichophytons ; ceux de Roger (4) sur les modifications du sérum des animaux

(1) E. BODIN et L. GAUTIER, Note sur une toxine produite par l'*A. fumigatus*. Ces *Annales*, 1906, p. 209.

(2) BRUNO BLOCH et R. MASSINI, Etudes sur l'immunité et l'hypersensibilité dans les maladies provoquées par les hyphomycètes. *Zeitschrift für Hyg. und Infectionkrankheiten*, 1909. Pl. 13, fasc. 1, p. 68. — BRUNO BLOCH, Die Trichophytien. *Medicinische Klinik*. Berlin, 1908, n° 51.

(3) M. TRUFFI, Ricerche sulla trychophitina. *Clinica medica italiana*, 1904.

(4) ROGER, Modifications du sérum des animaux vaccinés contre l'*Oïdium albicans*. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 4 juillet 1896.

vaccinés contre l'*Oïdium albicans*; ceux de Verliac (1) sur l'Actinomyces; les découvertes de Widal et Abrami (2), de Pautrier et Lutembacher (3), de Blanchetière et Gougerot (4), de de Beurmann sur les propriétés agglutinantes du sérum des malades atteints de mycoses.

Ajoutons que M. le professeur Roger (5) signalait récemment dans les extraits d'*A. fumigatus*, préparés par la trituration des cellules comme l'indique Concetti pour le muguet, la présence d'une substance toxique capable de déterminer la paraplégie chez le lapin.

Tout dernièrement enfin, B. Sauton (6) a montré que les spores d'*A. fumigatus* renferment une substance, soluble dans le chloroforme, qui les protège contre la phagocytose.

Existence de deux poisons différents dans les cultures d'*A. fumigatus*.

Nous dirons, d'abord, que nous avons trouvé dans les cultures d'*A. fumigatus* deux poisons distincts, l'un doué de propriétés tétanisantes et convulsivantes et l'autre possédant au contraire un pouvoir déprimant chez certains animaux. Ces substances sont bien les mêmes, à notre avis, que celles qui ont été signalées dans les cultures de ce champignon par Ceni (7)

(1) Verliac, Recherches expérimentales sur les toxines de l'Actinomyces. *Thèse de Paris*, 1907.

(2) Widal et Abrami, Séro-diagnostic de la sporotrichose par la séro-agglutination. La coagglutination mycosique, etc. *Soc. médic. des hôpit. de Paris*, 19 juin 1908. — Widal, Abrami, Joltrain, Brissaud et Weil, Séro-diagnostic mycosique. Ces *Annales*, 1910, n° 1.

(3) Pautrier et Lutembacher, Premier cas de sporotrichose diagnostiqué par une subcutiréaction positive. *Soc. médic. des hôpit. de Paris*, 9 juillet 1909.

(4) Blanchetière et Gougerot, Sur la composition chimique du Sporotrichum Beurmanni. Ses endotoxines. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 17 juillet 1909.

(5) Roger, Les endotoxines microbiennes. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 17 juillet 1909.

(6) B. Sauton, Germination *in vivo* des spores d'*A. niger* et d'*A. fumigatus*. Ces *Annales*, 1912, p. 48.

(7) Ceni et Besta, Ueber die toxine von Asp. fumig. und A. flavescens und deren Beziehungen zur Pellagra. *Centralbl. f. allg. Path. u pathol. Anatomie*, t. XIII, n° 23, déc. 1902, analysé in *Bull. de l'Inst. Pasteur*, t. I, p. 33. — Ceni et Besta, Die pathogen. Eigenschaften des Asp. niger mit Bezug auf die Genese der Pellagra, analysé in *Bull. de l'Inst. Pasteur*, t. III, p. 740.

C. Ceni, Potere patogeno dell Asp. ochraceus e suo rapporto coll' etiologia e patogenesi della pellagra. *Riv. speriment. di freniatria*, vol. XXXI, fasc. 2, 1905. — C. Ceni, Nuovi concetti sull' etiologia e cura della pellagra, *Giornale*

et Besta et par Paladino-Blandini (1). Voici l'expérience qui permet d'établir la coexistence des deux poisons dans une culture d'*A. fumigatus*.

Si l'on prend 250 cent. cubes de liquide de cultures d'*A. fumigatus* sur milieu de Raulin, après 5 à 6 semaines à l'étuve à 25 degrés, et si l'on traite ce liquide par l'éther que l'on évapore ensuite, on obtient un résidu gras, huileux, qui détermine chez le lapin et chez le cobaye, en injection sous-cutanée, des accidents tétaniques et convulsifs, débutant au bout de 30 à 40 minutes et qui entraînent la mort en quelques heures.

Or, si l'on reprend les 250 cent. cubes de liquide ainsi épuisés par l'éther et si on les distille, après action de la trompe pendant un temps suffisant pour enlever toute trace d'éther, de façon à obtenir rapidement 20 à 25 cent. cubes de distillat, on constate que ce produit, dont la réaction est fortement alcaline, est toxique pour le cobaye. Injecté sous la peau de cet animal, il cause des phénomènes de dépression et de paralysie qui commencent 20 à 30 minutes après l'injection et qui sont mortels en 1 à 2 heures.

Cette expérience permet de conclure à l'existence d'au moins deux substances toxiques : l'une, convulsivante, soluble dans l'éther; l'autre, déprimante, insoluble ou peu soluble dans l'éther et qui passe à la distillation du liquide de culture.

Poison déprimant. — Pour le moment, nous ne pouvons dire que très peu de chose du poison déprimant, dont la présence ne nous a pas paru absolument constante dans toutes les cultures. D'après nos observations, il existe surtout dans les cultures sur le liquide de Raulin, vieilles de plusieurs semaines et quand le milieu est devenu bien alcalin.

Il faut distiller le liquide de culture alcalin pour extraire le poison, car la neutralisation préalable avec un acide quelconque empêche la ou les substances toxiques de passer à la distillation.

Le distillat est lui-même fortement alcalin et il dégage une odeur ammoniacale; il agit comme un poison déprimant, même si on le neutralise exactement avec un acide comme l'acide tartrique ou l'acide chlorhydrique.

della Reale Soc. Italiana d'Igiene, 1905. — C. Ceni. Di una nuova specie di As. varians e delle sue proprieta patogene in rapporto coll' etiologia della pellagra, *Riv. speriment. di freniatia*, vol. XXXI, fasc. 3-4, 1905. — C. Ceni, Sulla reazione fenolica in rapporto coi tossici pellagrogeni, *Riv. pellagrologica Italiana*, 1906.

(1) Paladino-Blandini, Tossici di ifomiceti. *Arch. di farmacologia speriment. e Scienze affini*. Anno 5, vol. V, 1906.

Ce poison, qui résiste à l'ébullition, est actif sur le cobaye qu'il tue avec des phénomènes de paralysie et de dépression, sans déterminer d'accidents tétaniformes. 20 cent. cubes de distillat, obtenus avec 200 cent. cubes de liquide de culture de deux mois sur milieu de Raulin, tuent un cobaye adulte en une ou deux heures. Par contre, la même dose paraît inactive en injection sous-cutanée, ou en injection intraveineuse chez le lapin.

Poison tétanisant. — Méthode d'extraction : C'est celui que nous avons étudié partiellement dans notre premier travail, mais que nous n'avions pas réussi, à ce moment, à extraire facilement des cultures. Depuis, nous basant sur les travaux de Ceni et Besta, de Paladino-Blandini et aussi sur ceux de Auclair (1), nous avons utilisé une méthode qui nous a donné de bons résultats. Elle consiste à traiter par l'éther le liquide de culture, ou mieux les cultures elles-mêmes.

Procédant de la sorte, nous avons constaté que ce poison existe surtout dans la plante elle-même et qu'il ne passe dans le liquide qu'en petite quantité, parce qu'il est relativement peu soluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'éther, l'éther de pétrole, la benzine, le chloroforme, le sulfure de carbone, on peut aisément l'extraire à l'aide de ces solvants, parmi lesquels l'éther est celui qui nous a paru le meilleur et le plus commode.

Pour la préparation du poison, nous utilisons le champignon préalablement lavé à l'eau distillée, puis que l'on broie et que l'on met à macérer pendant 48 heures dans un mélange à parties égales d'alcool à 90 degrés et d'éther. Le liquide séparé par filtration est ensuite distillé dans le vide à 45 degrés jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un résidu aqueux trouble. On reprend ce résidu que l'on agite pendant quelques minutes dans une ampoule à robinet avec une ou deux fois son volume d'éther. On sépare l'éther que l'on évapore au bain-marie et l'on obtient un résidu huileux, jaunâtre, de consistance grasse, dégageant une odeur spéciale, rappelant celle de certaines plantes fraîches broyées, et dont la toxicité est très grande pour les animaux sensibles chez lesquels il détermine des accidents convulsifs et tétaniformes, comme il a été indiqué dans notre premier travail auquel nous renvoyons pour la description de ces symptômes.

Propriétés du poison. — Jusqu'ici, nous n'avons pu isoler le poison, de sorte que nous ne savons pas exactement de quelle

(1) Auclair, Recherches sur les poisons microbiens. *Arch. de méd. expérim.*, 1903, p. 725.

substance chimique il s'agit, ni même s'il n'y a pas plusieurs poisons. Nous avons pu cependant déterminer quelques-unes de ses propriétés en expérimentant avec la matière huileuse extraite des cultures, comme il a été dit précédemment, et qui renferme le ou les corps toxiques (1).

En ce qui concerne les symptômes que détermine, chez les animaux sensibles, le poison convulsivant, nous avons fait de très nombreuses expériences; elles ont toutes confirmé ce que nous avions dit à ce sujet dans notre premier travail. Nous indiquerons donc seulement quelques points particuliers et nouveaux que nous ont appris les nouvelles recherches faites avec une meilleure méthode d'obtention du poison.

En premier lieu, nous avons pu mettre en évidence la très grande toxicité de ce poison pour les espèces sensibles comme le lapin. Chez cet animal, il suffit, par la voie intraveineuse, de 1/10 de milligramme par kilogramme, de l'extrait huileux, obtenu comme il a été dit dans la note précédente, pour déterminer des accidents graves. Avec 1/2 milligramme par kilogramme, la mort survient presque fatalement. Or, il est évident que le poison ne représente qu'une partie de l'extrait injecté.

Comme, dans nos premières expériences, nous avons vu que la sensibilité du cobaye est moins grande que celle du lapin. Il faut ordinairement une dose triple (par kilogramme) de la dose mortelle pour ce dernier pour entraîner la mort du cobaye.

Ensuite, nous avons tenu à vérifier la résistance du pigeon à ce poison, résistance que nous avons déjà signalée et qui nous a semblé d'autant plus étonnante que l'on connaît la sensibi-

(1) Afin de purifier autant que possible le poison, nous avons utilisé sa solubilité partielle dans l'eau de la façon suivante : l'extrait éthéré de culture est agité fortement avec de l'eau distillée et il se fait une sorte d'émulsion. On filtre alors à la bougie Berkefeld pour obtenir un liquide limpide un peu opalescent. Ce liquide est repris par l'éther qui, évaporé, abandonne une huile jaunâtre ayant les caractères du poison. On reprend le résidu qui s'est déposé sur la bougie, on l'agite avec de l'eau distillée et on recommence l'opération indiquée ci-dessus. En faisant plusieurs fois de suite cette opération, on arrive à extraire la plus grande partie, mais non la totalité du poison. Si imparfaite qu'elle soit, c'est cette méthode qui nous a donné jusqu'ici les résultats les meilleurs, permettant d'obtenir la substance toxique débarrassée d'une partie des corps gras que l'éther enlève avec elle aux cultures du champignon.

lité de cet animal aux inoculations d'*A. fumigatus*. Divers essais nous ont donné des résultats identiques à ceux que nous avions obtenus en 1906 ; ils ont mis en relief la très grande résistance du pigeon au poison tétanisant, mais ils nous ont montré que cette résistance n'est cependant pas absolue. En employant de très fortes doses, on peut déterminer des accidents convulsifs et tétaniformes chez le pigeon, comme chez le lapin et chez le cobaye. Voici deux de nos expériences à cet égard.

Un pigeon ayant reçu la dose 200 fois mortelle pour le même poids de lapin, a présenté des accidents convulsifs et tétaniformes pendant 3 heures : il s'est rétabli le lendemain de l'injection. Dans une autre expérience, un pigeon de 330 grammes a reçu 560 fois la dose mortelle pour le même poids de lapin, il a eu des accidents tétaniques violents pendant 5 heures environ, mais 48 heures après il paraissait complètement rétabli.

Enfin, nous avons vu que le poison tétanisant est actif, chez le lapin au moins, quand on l'introduit par la voie digestive. En injectant le poison dans l'estomac à l'aide d'une sonde, nous avons déterminé des accidents tétaniques classiques entraînant la mort, mais il fallut employer une dose beaucoup plus considérable que dans les injections sous-cutanées ou intraveineuses.

Action de la température.

Dans notre premier travail, nous avions noté que le poison tétanisant de l'*A. fumigatus*, chauffé pendant plus de trente minutes au-dessus de 85 degrés, est certainement atténué, mais qu'il faut atteindre 120 degrés pendant trente minutes dans la vapeur d'eau pour que le poison, à la dose plusieurs fois mortelle, ne détermine plus d'accidents tétaniques chez le lapin ; remarquons toutefois qu'après avoir subi l'action de la température dans ces conditions, le poison cause encore chez les animaux sensibles certains phénomènes tels que anxiété, hyperexcitabilité, montrant que la substance toxique n'est pas complètement détruite.

Les nouvelles expériences que nous avons faites confirment ces conclusions. Par exemple, nous avons injecté au lapin, par voie sous-cutanée, 48 fois la dose mortelle de poison chauffé à l'autoclave à 120 degrés pendant quarante-cinq minutes; l'animal a très bien résisté, mais il a offert de l'anxiété au cours des deux heures qui ont suivi l'injection.

En outre, nous avons constaté que les conditions dans lesquelles le chauffage est opéré ont ici une importance de premier ordre. Le chauffage en présence de l'eau amène certainement une altération du poison plus ou moins rapide, suivant le degré de température et selon le temps de chauffe, tandis que le chauffage à sec semble sans action. Ainsi, en chauffant à 120 degrés pendant quarante-cinq minutes du poison bien sec dans un tube scellé, nous avons vu que les propriétés toxiques sont conservées. On peut en conclure que l'eau, à une température élevée et pendant un temps suffisant, exerce une action sur la molécule chimique du poison et qu'elle doit amener dans cette molécule des modifications qui atténuent les propriétés tétanisantes et convulsivantes. De l'indication fournie par ces faits, il nous paraît intéressant de rapprocher celle que donnent les expériences relatives à l'action des alcalis.

Action des alcalis et des acides. — En opérant avec la soude, nous avons vu, dans une série d'essais, que la toxicité du poison diminue et finit même par disparaître. Seulement les conditions de cette action (temps, température, degré de concentration, etc...) jouent un rôle très important qu'il nous est difficile de préciser pour le moment; voici deux expériences qui permettent de se rendre compte de cette action de la soude.

Un résidu aqueux contenant 4 fois la dose mortelle pour un cobaye a subi l'action de la soude à 2 1/2 p. 100 pendant cinquante-deux heures à 40 degrés : après ce temps, il s'est montré dépourvu de toxicité.

Un autre résidu aqueux contenant aussi 4 fois la dose mortelle pour le lapin, reste encore actif après action de la soude à 1 p. 100 à 37 degrés pendant quarante heures, mais sa toxicité est atténuée, car il ne détermine pas la mort.

Les acides nous ont paru beaucoup moins actifs que la soude; ainsi, en employant l'acide chlorhydrique, nous avons constaté qu'au taux de 2 1/2 p. 100 et après quatre jours à la température du laboratoire, les solutions aqueuses toxiques ont conservé leur pouvoir nocif vis-à-vis des animaux. Dans ce cas, il se produit une clarification du liquide sous l'influence de l'acide, avec formation d'un dépôt au fond du vase. C'est dans ce dépôt que l'on retrouve la plus grande partie du poison.

Dialyse. — Ajoutons enfin que le poison tétanisant passe à travers la membrane du dialyseur. Avec le liquide de culture ou avec une émulsion aqueuse, obtenue à l'aide de l'extrait éthéré de la plante elle-même, et après quarante-huit heures de dialyse à la température du laboratoire, nous avons trouvé le poison dans le liquide dialysé. Nous ferons remarquer que cette méthode pourrait être utilisée pour séparer, au moins partiellement, la substance toxique des extraits de culture.

Conditions d'apparition du poison dans les cultures d'Aspergillus fumigatus.

Munis d'une meilleure méthode d'extraction du poison, nous avons pu déterminer son existence avec beaucoup plus de précision que nous ne l'avions fait dans nos premières recherches, et nous avons vu que la formation de ce poison a lieu, dans toutes les cultures sur les divers milieux, dans des conditions beaucoup plus larges que nous ne le pensions tout d'abord.

Ainsi, les cultures sur solutions simplement peptonées à 1 p. 100 dont le développement reste médiocre, contiennent le poison : nous l'avons vérifié au bout de un mois de séjour de ces cultures à l'étuve à 25 degrés. Cependant il est certain que la production de la substance toxique est plus grande dans les cultures qui se développent abondamment sur les milieux favorables, comme sur le bouillon peptonisé à 1 p. 100 et glucosé à 3 p. 100. Sur ce milieu, nous avons décelé le poison dans la plante et dans le liquide de culture dès le quatrième jour, à l'étuve à 25 degrés. Après un mois, ces cultures sont très riches en poison.

Ceci est parfaitement conforme aux conclusions de Céni et Besta sur le même sujet, mais sur un autre point nous sommes en désaccord avec ces savants. En effet, dans leurs travaux, ils insistent sur la variation de production des poisons tétanisants de l'*Aspergillus fumigatus* (et d'autres champignons aussi), suivant les diverses saisons de l'année. D'après eux, ces plantes présentent leur maximum de sécrétions toxiques au printemps et en été : durant l'hiver, ce pouvoir diminue considérablement ou même disparaît tout à fait. Ce phénomène ne serait pas seulement en rapport avec les variations saisonnières de tem-

pérature, mais aussi avec d'autres conditions, car les auteurs sus-indiqués ont vu le pouvoir toxique disparaître pendant l'hiver dans des cultures d'*Aspergillus* maintenues à l'étuve à 37 degrés.

Or, après une étude de cinq années, au cours desquelles nous avons recherché un grand nombre de fois le poison tétanisant dans les cultures d'*Aspergillus fumigatus* développées dans notre laboratoire à l'étuve à 25 degrés, nous avons d'une manière constante trouvé ce poison quelle que soit l'époque de l'année et sans que nous puissions observer à cet égard de différences appréciables entre les cultures faites dans les mêmes conditions aux différents mois de l'année.

Nature du poison tétanisant.

Actuellement, il nous est impossible de préciser la nature chimique du poison tétanisant et convulsivant de l'*Aspergillus fumigatus*, et cette question nous paraît très difficile à résoudre. Céni et Besta pas plus que Paladino-Blandini, qui ont étudié ce poison, ne se prononcent à ce sujet : les premiers affirment seulement qu'il n'offre aucun rapport avec les composés phénoliques.

Les recherches que nous avons faites depuis 1906 nous autorisent cependant à dire que, contrairement à l'hypothèse émise lors de notre premier travail, le poison tétanisant et convulsivant de l'*Aspergillus fumigatus* n'appartient pas au groupe des toxines, si l'on prend ce terme dans son acception usuelle. Sa faible solubilité dans l'eau, sa solubilité très grande dans l'alcool, l'éther, le sulfure de carbone, le chloroforme, la benzine, sa résistance à la chaleur sont à cet égard des arguments très importants.

Nous ajouterons aussi que nous avons cherché en vain, avec nos extraits toxiques, les réactions classiques des alcaloïdes. Il paraît donc acquis que nous n'avons affaire, en l'espèce, ni à une substance d'ordre diastasique ni à un corps de nature alcaloïdique. C'est tout ce que, pour le moment, nous pouvons dire d'une façon précise.

S'il nous est permis toutefois de faire ici une hypothèse, sous toutes réserves, nous dirons qu'il est possible que ce corps,

doué de pouvoir tétanisant et convulsivant, appartienne au groupe chimique des substances grasses et particulièrement de celles que l'on étudie depuis un certain temps sous le nom de lipoïdes. Nous nous appuyons pour cela sur l'action des solvants tels que l'éther, l'alcool, le sulfure de carbone, le chloroforme, la benzine, sur la faible solubilité du poison dans l'eau, sur sa résistance à la chaleur, toutes propriétés qui se retrouvent chez les lipoïdes, parmi lesquels des travaux modernes, notamment ceux de Korschun, de Morgenroth, de Landsteiner, de Levaditi, d'Iscovesco, de Noguchi, de Lefman, de Bloch, de Bang, ont fait connaître diverses substances toxiques élaborées par les cellules vivantes.

DE LA VÉSICULE BILIAIRE ENVISAGÉE COMME LIEU D'INOCULATION

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ ET A LA PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE

par HENRI VIOLLE
de la marine de guerre.

INTRODUCTION

De tous les modes d'inoculation vaccinale, le meilleur à employer serait assurément celui qui, tout en provoquant chez l'animal opéré le moins de réaction possible, l'immuniserait rapidement et intensivement. Il est évident que des bactéries ou des toxines ne peuvent être injectées dans l'organisme par doses massives intermittentes, ce qui produit chez l'animal des ressauts de réaction violente, mais plutôt d'une façon lente et continue, afin que le sujet, recevant à chaque instant le virus ou la toxine, soit totalement et doucement imprégné par lui. Il peut alors réagir sans grand fracas et faire inconsciemment, pour ainsi dire, son immunisation. La méthode des inoculations successives, par doses croissantes de virus, dont le degré de toxicité augmente parallèlement, répond à ce but. C'est elle, en effet, qui dans la pratique des vaccinations fournit les meilleurs résultats.

Mais, là encore, l'immunisation ne peut se faire que par petits à-coups, par oscillations successives, dont on ne saurait prévoir la grandeur; la période d'immunisation est en outre fort longue, se chiffrant par plusieurs mois (4, 5, 6 et plus); et les phénomènes intimes qui président à l'élaboration des anticorps sont difficiles à surprendre.

Un antigène virulent, placé dans l'organisme en une position telle qu'il pourrait difficilement se généraliser, mais facilement être atteint par les leucocytes bactériophages, provoquerait la formation abondante d'anticorps spécifiques. Mais est-il possible de résoudre ce problème? Autrement dit, peut-on trouver dans

l'organisme un point tel que les bactéries virulentes situées en ce lieu et ne le pouvant quitter, sauf dans des cas très rares, restent soumises à l'action des leucocytes, dont le but est de détruire ces corps bactériens et de produire des anticorps?

Le sac de collodion, chargé de bactéries et déposé dans la cavité péritonéale d'un animal, afin d'obtenir par des passages successifs un renforcement de virulence (Roux, Metchnikoff et Salimbeni), ne paraît pas directement applicable.

En effet, si l'on introduit dans la cavité péritonéale d'un lapin un sac de collodion renfermant 1 centimètre cube de culture typhique de 24 heures en bouillon, et que l'on procède tous les 3 jours à des essais de mensuration du taux agglutinatif du sérum de l'animal, on ne constate qu'un renforcement très faible des propriétés agglutinantes de ce sérum.

Deux lapins, l'un ayant depuis 1 mois un sac de collodion, ensemencé avec une culture typhique, et l'autre servant de témoin, sont inoculés intrapéritonéalement avec une culture typhique à dose mortelle (environ 10 centimètres cubes). Les deux animaux meurent, à peu près dans le même laps de temps; il n'y a pas eu d'immunisation forte chez le premier sujet dont la mort survient quelques heures après celle du témoin. Il paraît s'ensuivre que des corps bactériens inclus dans des cavités closes et imperméables ne permettent point l'élaboration d'anticorps spécifiques. Toutefois, la question est plus complexe, ce qui explique quelques résultats différents.

C'est ainsi qu'avec des microbes extrêmement virulents pour une espèce animale, la méthode des sacs de collodion chargés de ces cultures a procuré quelques propriétés vaccinantes aux animaux en expérience. Il en est ainsi avec le choléra des poules, où Bisanti trouvait qu'après 20 jours les sujets résistaient à l'ingestion d'une culture virulente. Dans ce cas, les anticorps formés sont antitoxiques, puisque la mince paroi de collodion s'oppose au passage des corps organisés (microbes ou phagocytes) mais laissent diffuser dans l'organisme les toxines microbiennes, ou plus exactement certaines toxines (Rodet et Guecheff). Il en résulte que si l'on a affaire à une toxine dialysable très active, comme celle pouvant être produite par le bacille tétanique, les leucocytes, ne pouvant atteindre les spores protégées par la membrane de collodion ou mieux par

une membrane de papier, plus perméable à la toxine (Vaillard, Vincent et Rouget), l'animal succombera au tétanos. En effet, les spores, se développant, donneront des bacilles qui sécréteront la toxine mortelle.

Le procédé du sac de collodion serait donc utilisable s'il pouvait être également perméable aux leucocytes et imperméable aux bactéries. Ces conditions, en apparence contradictoires, nous les trouvons dans la vésicule biliaire de certains animaux et en particulier du lapin.

VÉSICULE BILIAIRE
TECHNIQUE DE L'INOCULATION INTRAVÉSICULAIRE

I. — Vésicule biliaire.

La vésicule biliaire chez le lapin se présente sous la forme d'un sac ovoïde ayant en moyenne 2 centimètres de longueur suivant son grand axe et 1 centimètre de largeur. Sa capacité est d'environ 1 centimètre cube, mais très irrégulière, puisque, avec des animaux de poids égaux, ce nombre peut varier du simple au triple.

Sa paroi est constituée par deux tuniques, l'une externe se subdivisant en deux zones : périphérique, fibreuse; centrale, musculaire. Cette couche comprend des fibres longitudinales externes, circulaires internes; l'autre interne, muqueuse, comprenant un chorion constitué par un tissu conjonctif réticulé. Des amas leucocytaires, véritables follicules clos, sont répandus dans ce chorion qui se soulève en plis saillants, nombreux et très irrigués. Au-dessus, outre le derme et l'épithélium, on constate la présence d'une membrane basale. L'épithélium est simple, prismatique, à noyau ovoïde et revêtu d'un plateau strié.

Mais quels sont les rapports de cette vésicule avec le foie, avec la circulation locale et générale ? Est-elle, abstraction faite de la région canaliculaire qui s'anastomose avec le canal hépatique, absolument indépendante ?

Elle présente des connexions avec les tissus hépatiques, et elle est reliée par des vaisseaux au reste de l'organisme.

Ses faces latérales externe et interne, sa face inférieure et son pôle, revêtus par le seul feuillet viscéral du péritoine, sont

libres de toute adhérence et permettent, en n'importe quel point, d'atteindre la vésicule. Mais sa face supérieure est intimement reliée au tissu hépatique; ni la déplétion, ni la réplétion de la vésicule ne permettent de la libérer de ses adhérences. La tunique fibro-musculeuse adhère là au parenchyme par l'intermédiaire d'un tissu cellulaire assez épais. Les connexions vont plus loin : elles sont non seulement tissulaires, mais encore

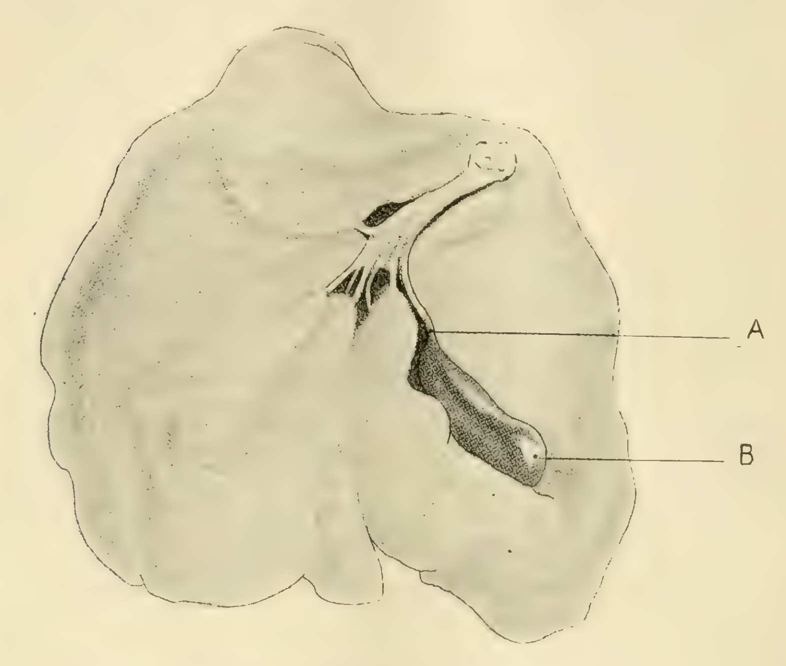


Fig. 1. — *Foie normal de lapin.*

A, Point où la vésicule biliaire est liée. — B, Point où la vésicule biliaire est ponctionnée.

vasculaires; et, dans cette région vésiculaire adhérente, on trouve les artères perforantes qui vont directement du foie à sa face supérieure, et des veines cystiques profondes qui pénètrent dans la fossette cystique et se ramifient à la manière des artères, formant un système de veines portes accessoires. Il en résulte que les communications entre le foie et la vésicule biliaire restent bien établies, alors même qu'une ligature est posée au col et comprend le canal cystique, l'artère cystique et les veines cystiques superficielles. Ces communications

hépato-vésiculaires sont mises en évidence par les inoculations de substances toxiques et par celles de corps microbiens.

I. *Injection de substances toxiques.* — Etant donnés deux lapins de même poids, on inocule à l'un, dans la veine marginale de l'oreille, 10 milligrammes de sulfate de strychnine, dis-

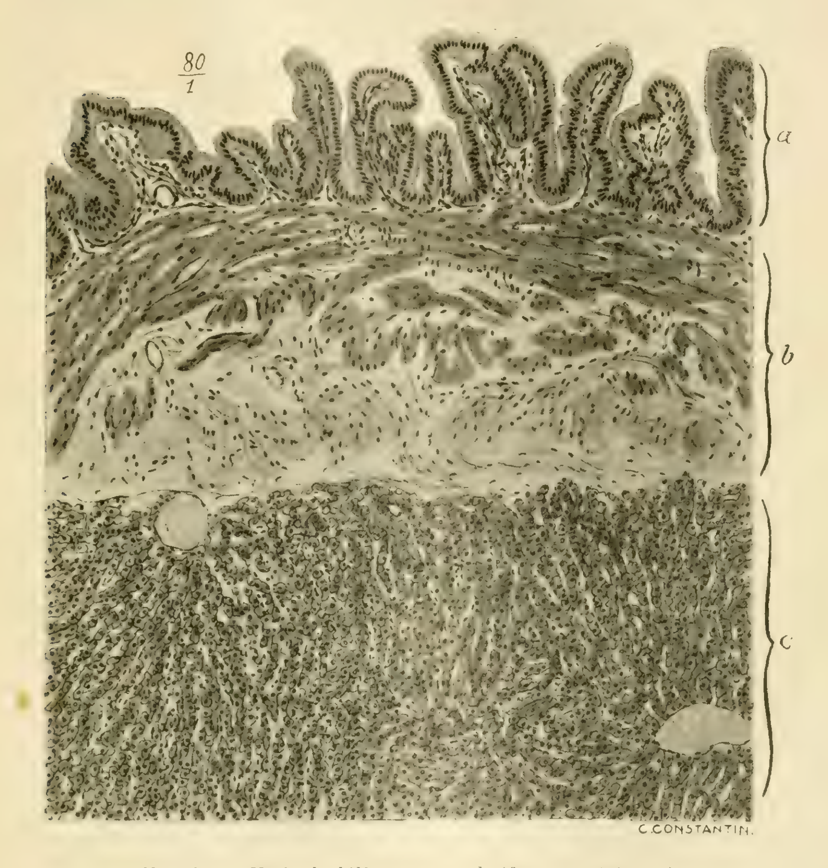


Fig. 2. — *Vésicule biliaire normale* (face supérieure).

a, Muqueuse : endothélium, chorion. — *b*, Couche musculo-fibreuse. *c*, Tissu hépatique.

sous dans 1 cent. cube d'eau stérilisée. La mort est immédiate par convulsions et tétanisation généralisées, se produisant avant même que l'aiguille soit retirée.

Si l'on fait une injection semblable au second lapin, mais en inoculant la solution dans la vésicule biliaire liée, on obtient

des résultats qui, quoique se rapprochant beaucoup des précédents, en diffèrent toutefois par la longueur d'évolution. Là encore, l'animal meurt, mais les phénomènes morbides n'apparaissent pas avec l'instantanéité précédente : pendant les 10 premières minutes, aucun symptôme ne se manifeste; puis, ce laps de temps écoulé, quelques convulsions apparaissent, donnant le signal du drame qui se déroule en quelques minutes.

II. *Inoculation de microbes.* — On prend deux lapins : l'un reçoit en injection intraveineuse 1 centimètre cube d'une culture charbonneuse en bouillon à 37 degrés, âgée de 8 jours; l'animal meurt en 24 à 36 heures généralement, avec les lésions caractéristiques du charbon. L'autre animal reçoit la même solution en même quantité dans la vésicule biliaire liée; il meurt également, mais avec un léger retard, après 48 à 52 heures.

Il résulte de ces faits que la paroi vésiculaire laisse passer ces différents corps en solution aqueuse, en bouillon, en eau peptonée, etc...

On voit, en outre, que les antigènes ne subissent pas de transformation appréciable dans leur passage à travers le foie, quoique ce dernier ait un rôle protecteur et éliminateur contre les toxines exogènes (1) et endogènes (2).

Les propriétés que nous venons de signaler ne sont pas particulières à la vésicule du lapin. Chez le cobaye, le mouton et le bœuf, la vésicule présente également des adhérences.

Chez le cobaye, la vésicule biliaire, relativement très grosse, présente une paroi mince et translucide, à travers laquelle apparaît la bile, jaune clair et très limpide. La face supérieure vésiculaire est entièrement et intimement adhérente au foie, sans présenter de plan de clivage, de telle sorte que toute séparation des deux organes entraîne un déchirement du tissu hépatique. Les vaisseaux allant de l'un à l'autre de ces organes sont situés dans la zone d'adhérence.

Chez le mouton, la vésicule, de dimensions très variables, parfois même totalement atrophiée, ayant d'ordinaire le

(1) Heger (1873), Roger (1887).
(2) Dastre, *Dictionnaire de Physiologie.* Article « Foie ».

volume d'une figue, présente aussi avec le tissu hépatique des adhérences, comprenant dans leur intérieur de nombreux vaisseaux établissant la circulation entre les deux organes. Ces adhérences sont situées à la face supérieure, laissant libre le pôle vésiculaire et comprenant seulement la portion moyenne et canaliculaire de la vésicule.

Chez le bœuf, la vésicule est de forte dimension, ovoïde, ayant de 15 à 20 centimètres de long suivant son grand axe, à parois épaisses, vascularisées; le contenu est d'environ 150 à 200 grammes de bile; la face supérieure présente également de fortes adhérences avec le foie et de nombreuses vascularisations.

Chez le cheval, on sait que la vésicule biliaire fait défaut.

II. — Technique de l'inoculation intra-vésiculaire.

La méthode que nous avons employée pour faire les inoculations dans la vésicule biliaire du lapin est la suivante :

Dans les premiers essais que nous fîmes, nous atteignions la vésicule en faisant l'incision suivant le rebord des fausses côtes droites. Le dégagement du foie était plus aisé et la mise à nu de la poche vésiculaire rendue ainsi très facile; mais l'opération était un peu longue par suite de la section des plans musculaires et de la ligature souvent obligatoire de l'artère mammaire droite.

C'est pourquoi, dans toutes les opérations suivantes, nous opérâmes suivant la ligne blanche en procédant aux différents temps que voici :

L'animal étant attaché par les membres sur un plateau de zinc, la région à opérer est épilée, puis aseptisée à l'alcool et à la teinture d'iode. On fait l'anesthésie à l'éther, si l'animal est trop sensible, car les mouvements brusques à certains temps délicats (injection dans la vésicule) peuvent compromettre le résultat de l'opération. Les téguments sectionnés suivant la ligne médiane, on tombe sur la ligne blanche, que l'on incise sur une longueur de 4 à 6 centimètres. On déchire le léger voile constitué par le péritoine, et le foie apparaît. On attire l'organe en bas, et on l'éverse de bas en haut et d'arrière en avant : le foie luxé, la face inférieure est ainsi mise à jour. En inter-

posant, d'une part, des tampons de gaze entre la coupole diaphragmatique et le foie ; en bourrant, d'autre part, l'espace intermédiaire entre la région inférieure du foie et les intestins, on « cale » la masse hépatique ; et les manœuvres de la vésicule, très en évidence, sont aisées. On passe sous le col ainsi dégagé, un fil de soie monté sur une aiguille de Reverdin, et on lie le canal en ce point. A l'aide d'une seringue de Pravaz ponctionnant la vésicule à son pôle libre, on aspire le contenu vésiculaire qui, dans beaucoup de cas, est riche en mucine, en sels concrétés, et forme ainsi un liquide épais, qui difficilement pénètre dans l'aiguille. En le diluant et en lavant la vésicule à plusieurs reprises avec de l'eau physiologique jusqu'à ce qu'elle sorte complètement incolore, on a un réservoir d'une capacité de 1/2 à 1 centimètre cube 1/2, prêt à recevoir les inoculations de liquide pathogène. L'aiguille étant toujours en place (car il serait, dans le cas où on l'aurait retirée, très difficile de retrouver le premier orifice) et la seringue étant chargée du liquide antigénique, on pousse l'injection doucement jusqu'à ce que la vésicule ait atteint son volume primitif. A ce moment, toujours sans retirer l'aiguille, on passe un fil de soie comprenant dans sa boucle cette aiguille et la paroi vésiculaire, légèrement soulevée et tendue par une pince. Tout en dégageant l'aiguille, on serre le fil de façon que celle-ci, complètement retirée, aucune goutte de liquide ne vienne à sortir. Enfin, pour plus de sûreté, on met une pointe de feu sur l'orifice. On

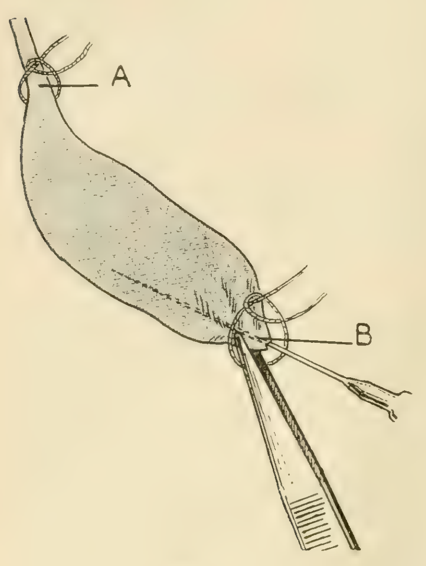


Fig. 3. — Schéma indiquant le mode d'inoculation intra-vésiculaire.

A, Point où la vésicule est d'abord liée. — B, Point où la vésicule est ensuite ponctionnée : la bile est retirée par aspiration et remplacée par un antigène, puis la vésicule est liée en ce point.

enlève les tampons, on suture la ligne blanche à l'aide de trois ou quatre points de catgut. Les téguments sont réunis par quelques agrafes de Michel. En dernier lieu, on badigeonne à la teinture d'iode la plaie suturée, que l'on recouvre d'un peu de collodion.

OBTENTION D'ANTICORPS PAR INOCULATION DANS LA VÉSICULE BILIAIRE

A la suite d'inoculations intravésiculaires de divers antigènes, l'organisme réagit par la formation d'anticorps spécifiques correspondants.

I. — Mais il est de toute nécessité de transformer la vésicule en un sac clos, ce qui s'obtient par la ligature du col. Autrement l'antigène inoculé dans la vésicule biliaire préalablement vidée de son contenu, mais libre, s'éliminera rapidement par voie intestinale sans provoquer la formation d'anticorps.

Exemple : Lapin n° 26 reçoit le 20 juillet dans la vésicule libre, sans contenu biliaire et lavée préalablement à l'eau légèrement alcalinisée, 1/2 tube de culture cholérique à 37 degrés sur gélose de 24 heures diluée dans 1 centimètre cube 1/2 d'eau physiologique. La température, 24 heures après, s'élève très légèrement (1° à 1° 1/2) durant 24 heures pour revenir ensuite à la normale. Le taux agglutinatif du sérum qui, avant l'opération, était de 1 pour 5, se maintient à ce chiffre 8, 10 et 15 jours après l'opération.

A ce moment, l'animal est sacrifié; la vésicule biliaire est sans adhérence, sans épaississement des parois, mais présente une très légère congestion de la muqueuse; son contenu est vert clair, constitué par de la bile, qui a rempli à nouveau la poche vésiculaire. Microscopiquement, ce liquide contient une proportion très élevée de cellules endothéliales; on ne voit ni leucocytes, ni bactéries. Toutefois, l'ensemencement en eau peptonée est positif et montre la présence de vibrions.

En un mot, l'inoculation de vibrions cholériques dans la vésicule biliaire libre a provoqué une légère réaction de la muqueuse; les vibrions cholériques ont disparu en grande partie après 10 à 15 jours et n'ont pas engendré la formation d'anticorps spécifiques.

Les ensemencements en eau peptonée de sang prélevé par

ponction intracardiaque pendant les 15 jours suivant l'inoculation, sont restés négatifs.

II. — Au contraire, l'antigène inoculé dans la vésicule transformée en cavité close donnera naissance à des anticorps.

Prenons le cas des vibrions cholériques inoculés dans une vésicule liée : après quelque temps, 10 à 15 jours, le sérum jouit de propriétés immunisantes.

III. — Si l'on vient à inoculer dans la vésicule liée une culture microbienne, mais cette fois préalablement tuée par la chaleur, l'animal ne paraîtra point réagir, et cette inoculation passera inaperçue. Toutefois, le sérum contient des anticorps, comme dans le cas précédent, quoiqu'en plus faible proportion.

A l'autopsie, faite 2 à 3 semaines après l'inoculation, on rencontre toujours une vésicule hypertrophiée, à contenu caractéristique. Au contraire, la vésicule est-elle liée après aspiration de son contenu et laissée vide, elle ne tarde pas à s'atrophier, et, au bout de quelques semaines, elle présente l'aspect d'une membrane desséchée et ridée.

Par quel mécanisme peut-on expliquer la production des divers anticorps?

Anatomiquement, nous constatons toujours, à la suite de nos opérations sur la vésicule liée, la même série de lésions, quel que soit l'antigène inoculé (virulent ou non : bactéries, toxines, hématies ou substances albuminoïdes); la vésicule biliaire a changé de volume, elle s'est hypertrophiée jusqu'à atteindre dans certains cas le volume d'un œuf de poule (voir les observations relatives à l'inoculation du bacille typhique).

La paroi est épaissie, indurée. Histologiquement, on constate en parcourant la coupe de dedans en dehors (voir figures aux chapitres « Choléra » et « Tuberculose ») :

1° *Que la tunique interne* ou muqueuse présente :

α) Un épithélium intact, à cellules peu desquamées, ni atrophiée ni hypertrophiées. Mais, entre ces cellules, on rencontre un très grand nombre de globules blancs (polynucléaires) se glissant soit vers la tunique externe, où ils transportent avec eux les anticorps élaborés, soit dans l'intérieur de la vésicule à l'effet de détruire l'antigène inoculé;

β) Un chorion très fortement épaissi et dont l'architecture

est modifiée par la triple présence de globules blancs (polynucléaires et mononucléaires) en abondance, de fibres conjonctives, de vaisseaux de néo-formation consistant en capillaires nombreux;

2° *Que la tunique externe* présente également une abondance anormale de leucocytes et de capillaires, mais laissant subsister intacte l'architecture primitive.

A l'intérieur de la poche, on trouve une substance semi-liquide essentiellement constituée par des globules blancs (polynucléaires).

Si nous prenons le vibrion cholérique, par exemple, nous voyons qu'à son début, dans les premières heures qui suivent l'opération, il est en extrême abondance; injecté en petite quantité, il a pu dans ce milieu favorable se développer; sous son action, la muqueuse vésiculaire est rouge, congestionnée, desquamée, laissant tomber dans le liquide une quantité énorme de cellules endothéliales. Puis, les leucocytes commencent déjà à apparaître; très mobiles, attirés par un chimiotactisme positif (toute toxine, tout corps microbien en faible proportion jouit de cette propriété), ils sont venus des différents points de l'organisme. Ils ont passé par les capillaires qui forment un réseau à la face supérieure de la vésicule, intimement reliée, nous le savons, à la face inférieure du foie. Grâce aux anastomoses vasculaires, et malgré la ligature du col qui intéresse le canal cystique et la plus grande partie des voies sanguines irriguant la vésicule, les leucocytes ont pénétré à travers les diverses tuniques vésiculaires et sont tombés dans la cavité même, se trouvant ainsi en présence des corps microbiens. Là, sous l'influence des toxines sécrétées, une partie des leucocytes a été détruite; mais l'afflux continuant à se produire, les globules blancs, à leur tour, toujours renouvelés, ont pu vaincre la résistance microbienne, et, par leur action diastatique propre, immobiliser, puis englober et finalement détruire les vibrions. Aux dépens de ces corps microbiens disparus, se sont élaborées, dans le cytoplasme leucocytaire, des substances actives qui, lors d'une nouvelle injection cholérique, viendront sensibiliser les nouveaux vibrions dont la destruction sera parachevée par les alexines banales du sérum. C'est là, schématiquement résumée, dans le cas actuel, la théorie de

Metchnikoff sur l'immunité, théorie phagocytaire grâce à laquelle les phénomènes qui se passent dans la vésicule s'expliquent aisément, et sans laquelle, par contre, il est impossible, avec les seules théories humorales, d'interpréter les faits. Le leucocyte joue dans ces phénomènes d'élaboration des anticorps le rôle prépondérant : sans leucocytes, point de vaccination possible, point d'anticorps pouvant se former. Les expériences citées plus haut le prouvent avec évidence. Vient-on à favoriser l'afflux leucocytaire dans la vésicule, des anticorps se forment en plus ou moins grande abondance; vient-on au contraire à entraver cette leucocytose, à interdire aux globules blancs l'entrée de cette poche vésiculaire, on ne perçoit pas la plus faible réaction d'immunité.

A la suite de la résorption des corps étrangers, les leucocytes se mettent à élaborer une grande quantité de sensibilisatrices ou phylocytases, et l'on admet que la rate, la moelle osseuse, les ganglions, sont les foyers producteurs de ces substances. Élaborées en certains points seulement, elles resteraient localisées dans ces mêmes globules blancs qui les ont engendrées; ou bien, éliminées par ces leucocytes encore vivants, elles se disperseraient dans le plasma, se généraliseraient dans tout l'organisme. Et, de fait, ces deux hypothèses se justifient par les constatations suivantes :

1° Dans le sérum on trouve, après quelques jours, des anticorps parfois en quantité notable, capables, à faible dose, de neutraliser des toxines très actives : les agglutinines, les précipitines, les sensibilisatrices, les antitoxines, etc., sont, en effet, en circulation dans le plasma.

2° Dans les foyers d'élaboration, ces mêmes substances se trouvent naturellement présentes. Or, dans le cas d'inoculation intravésiculaire, le point d'origine de formation des anticorps est, avant les ganglions, avant la moelle osseuse et la rate, assurément la vésicule dans laquelle on a inoculé l'antigène (1).

(1) Vu la difficulté qu'il y a à apprécier d'une manière exacte la teneur en leucocytes dans le sang périphérique d'un lapin, cette teneur variant dans des limites extrêmes d'un instant à l'autre, 8.800 à 13.000 selon Tallquist et Villebrand, et, d'après Besançon et Labbé (*Traité d'hématologie*, p. 308), « les variations physiologiques étant encore beaucoup plus étendues » et faussant tout résultat, nous nous sommes abstenu de faire les numérations leucocytaires.

Les faits expérimentaux le prouvent (voir 2e partie : vibrion cholérique et bacille tuberculeux).

Le contenu vésiculaire est donc doué de propriétés vaccinantes au même titre que le sérum. Autrement dit, il semble vraisemblable que les globules blancs, générateurs des anticorps, conservent ces derniers dans leur cytoplasme en proportion si appréciable que la quantité vaccinante leucocytaire est supérieure à la dose également vaccinante sérique : c'est-à-dire que la concentration en anticorps est plus grande, à volumes égaux, dans le suc vésiculaire que dans le sérum où ils se trouvent plus ou moins fortement dilués.

Il est donc probable qu'il y aurait intérêt dans ce cas à utiliser, comme moyen d'immunisation, non pas le sérum, mais les globules blancs qui en contiennent toutes les substances actives, et ne paraissent pas présenter, par contre, les mêmes propriétés toxiques.

La présence des leucocytes dans la vésicule persiste très longtemps. Quel que soit l'antigène inoculé, à l'autopsie, on trouve toujours dans la poche vésiculaire des globules blancs ; ils ne sont jamais complètement détruits et résorbés; après 5, 6 et 7 mois (date ultime à laquelle nous avons sacrifié les animaux), la vésicule a conservé son contenu leucocytaire, la proportion des éléments vivants aux éléments morts paraissant passer par trois phases successives :

1° Dans la première, qui suit l'opération, et qui dure de 24 à 48 heures, les leucocytes sont en grande partie détruits, aussitôt leur arrivée dans la vésicule.

2° Dans une seconde période, allant du 2e au 15e jour environ, c'est-à-dire durant toute la phase d'élaboration des anticorps, la proportion des éléments vivants l'emporte sur celle des éléments tués.

3° Dans une troisième et dernière période, débutant vers le 15e jour et dont la terminaison ne se fait que très tardivement, de nouveau la proportion de cellules dégénérées vésiculaires est supérieure à celle des cellules encore jeunes.

Par contre, la vitalité des corps microbiens dans la vésicule se montre de courte durée. Après 15 jours, dans tous les cas de choléra observés, l'eau peptonée, ensemencée avec le liquide vésiculaire restait stérile et les frottis de ce

liquide n'indiquaient jamais la présence de corps vibrioniens.

Pourtant, d'autres bactéries semblent résister davantage à l'afflux considérable des leucocytes : le bacille tuberculeux aviaire, 6 mois après son inoculation dans la vésicule, était encore en abondance quoique en quantité moindre qu'au début ; ses formes étaient nettes et le protoplasme se colorait très aisément. Mais ces bacilles devaient être, sinon tués, du moins excessivement atténués, puisque le contenu de la vésicule n'est jamais parvenu, en injection intraveineuse, à tuer le lapin, et en injection sous-cutanée, à déterminer des lésions chez le cobaye, alors que les témoins inoculés, avec la même dose de bacilles frais, mouraient dans un espace de temps très court (lapin) ou présentaient des lésions tuberculeuses (cobaye).

Ce fait que, très longtemps, plusieurs mois après l'inoculation, la vésicule montre encore la présence de leucocytes (la plupart dégénérés), doit faire émettre l'hypothèse que le sujet est encore en état d'immunité ou que la vaccination persiste. Et, en effet, 4 mois après l'injection intra-vésiculaire de bacilles tuberculeux, l'inoculation à dose mortelle en injection veineuse de nouveaux bacilles ne provoquait aucune réaction chez l'animal ; l'immunité avait donc persisté durant tout ce laps de temps. Il est probable qu'elle se maintient encore beaucoup plus longtemps.

S'il paraît vraisemblable que la formation des anti-corps est due essentiellement au contenu vésiculaire, la suppression de la vésicule fera cesser l'immunité. Elle doit replacer l'animal dans son état antérieur de réceptivité, le jour où les substances vaccinantes répandues dans l'organisme seront éliminées.

Et c'est, en effet, ce que l'on constate

Exemple : Lapin 82 est inoculé le 1[er] novembre intravésiculairement (vésicule liée) avec une culture cholérique en eau peptonée.

10 jours après l'opération, le taux agglutinatif de 1/10 (chiffre initial) s'élève à 1/500 et s'y maintient.

20 jours après l'inoculation, l'animal est opéré à nouveau et la vésicule biliaire, gonflée, légèrement hypertrophiée, aux parois épaissies et déjà indurées, et au contenu leucocytaire assez abondant, est réséquée.

15 jours après cette ablation vésiculaire, le taux agglutinatif était redescendu à 1/10.

Dans la plupart des méthodes d'immunisation, il est une période comprise entre l'inoculation vaccinante et l'apparition des anticorps dans le sang, véritable phase négative pendant laquelle le sujet est en état de réceptivité vis-à-vis de l'affection contre laquelle on l'immunise. Besredka, par sa méthode des bacilles sensibilisés, est arrivé à supprimer cette période d'hypoimmunisation. Par les procédés d'inoculation intravésiculaire, cette phase négative serait également absente. Chez deux lapins, l'un déjà inoculé intravésiculairement avec une cul-

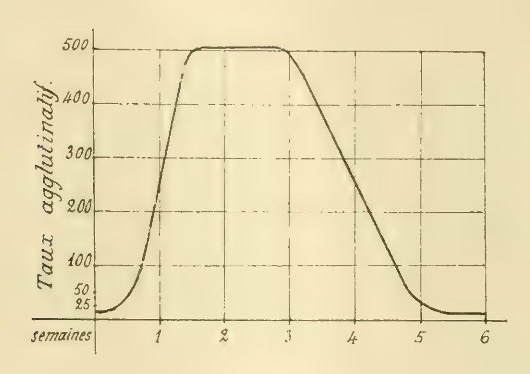


Fig. 4.

ture cholérique, l'autre neuf, une injection intraveineuse à dose minima mortelle détermine la mort dans le même laps de temps (en l'espèce, 10 à 12 heures). Et de même, une dose maxima non mortelle ne détermine la mort chez aucun des deux sujets. Il n'y a donc pas non plus d'hypersensibilité réceptrice chez l'animal inoculé intravésiculairement quelques jours auparavant.

IMPERFECTIONS DE L'INOCULATION DANS LA VESICULE BILIAIRE

L'immunisation par la vésicule biliaire se trouve en défaut dans le cas des bacilles peu virulents, et ne peut être employée, sans modifications, dans le cas des bacilles trop virulents.

1° Dans le premier cas, la quantité inoculée, nécessairement

toujours faible, n'amène pas la formation d'anticorps. C'est ce qui nous arriva avec le coli-bacille, par exemple (voir 2e partie). Le sérum d'animaux opérés 8, 15 et 25 jours auparavant, ne présentait aucune des substances agglutinantes, précipitantes, indicatrices ou contemporaines de la vaccination.

Cela d'ailleurs ne fait que rentrer dans la loi générale, qui préside à l'immunisation, et d'après laquelle la proportion d'anticorps varie parallèlement à la toxicité ou à la virulence de l'antigène injecté ;

2° Dans le second cas, les bactéries inoculées se généralisent à l'intérieur de l'organisme, causant rapidement la mort de l'animal. L'injection intravésiculaire s'est comportée comme une injection intraveineuse, offrant les mêmes inconvénients et les mêmes dangers. C'est là ce qui survient lors de toute inoculation intravésiculaire charbonneuse ; la mort arrive régulièrement 48 à 52 heures après l'opération. Il en est de même avec les bacilles diphtériques, dysentériques, les staphylocoques, streptocoques et pneumocoques. Certains bacilles, le vibrion cholérique, par exemple, restent le plus souvent localisés dans la vésicule, mais dans quelques cas que l'on ne peut prévoir, ils passent dans la circulation générale et tuent l'animal.

On peut tenter le maintien de bactéries virulentes dans l'intérieur de la vésicule, soit en atténuant leur virulence, soit en renforçant l'afflux leucocytaire. On obtiendra d'excellents effets avec les deux procédés employés de concert. L'atténuation seule de la virulence donne déjà de bons résultats. Elle peut être facilement obtenue par le chauffage au bain-marie des cultures entre 55 et 60 degrés durant 1/2 à 1 heure. Les bactéries ainsi modifiées deviennent plus aisément la proie des leucocytes ; elles ne se généralisent donc dans l'organisme que très difficilement. Par contre, elles provoquent l'élaboration d'anticorps, que l'on met aisément en évidence dans le sérum. Mais la production de ces récepteurs est moins abondante que celle qu'entraînent les bacilles vivants et virulents.

POURQUOI LA BILE DOIT ÊTRE ÉVACUÉE DE LA VÉSICULE
ACTION ANTILEUCOCYTAIRE
ACTION DIFFÉRENTE SUR DIVERSES BACTÉRIES

Dans son ensemble, la bile a, vis-à-vis des leucocytes, un pouvoir chimiotactique négatif intense. Les bactéries inoculées dans la vésicule, le suc biliaire non retiré, peuvent parfois rester un temps très long avant de disparaître. Ceci se constate surtout si les bactéries sont en faible proportion, car un double effet chimiotactique sera en jeu; d'une part, l'action retardatrice puissante de la bile; d'autre part, l'action favorisante positive très nette des bactéries ou toxines en petite quantité.

A dose plus élevée, en effet, les corps bactériens et toxiques retardent au contraire la phagocytose et peuvent même l'entraver complètement. Suivant donc la quantité de bile laissée dans la vésicule, et la quantité des bactéries ou toxines ajoutées dans cette même vésicule, on obtiendra un mélange dont l'action résultante sera positive, indifférente ou négative, vis-à-vis de la leucocytose.

Enfin la bile, milieu extrêmement complexe, a également une action propre sur les bactéries, mais les modifications qu'elle peut leur imprimer sont encore profondément différentes suivant les cas, parfois même opposées.

La bile vis-à-vis du pneumocoque (Neufeld, Nicolle et Adil bey), du gonocoque, du méningocoque (Jungano), des diplocoques se rattachant à cette même famille, aura une action bactéricide et lytique puissante. Dans 2 centimètres cubes d'une culture en bouillon de pneumocoque, âgée de 24 heures, une faible quantité (0 cc.1 à 0 cc.2) de bile de bœuf provoquera la destruction, la désintégration complète des éléments bactériens. La culture s'éclaircit en 15 minutes et l'examen direct, l'ensemencement, l'inoculation, révèlent l'absence de tout germe visible, vivant et virulent (phénomène de Neufeld). Les mêmes phénomènes se produisent avec la bile de lapin dans des cultures de méningocoques et de gonocoques.

Au contraire, la bile pure de bœuf, ensemencée avec une culture de bacilles typhiques, colibacilles, paratyphiques, etc.,

favorisera le développement de ces bactéries (milieu d'enrichissement de Conradi pour le bacille d'Eberth); il en est de même avec la bile de lapin ensemencée avec les bacilles typhique, coli et le vibrion cholérique. Bien mieux, ce sera un milieu de prédilection pour ces éléments bactériens, qui s'y développeront avec une rapidité beaucoup plus grande que dans toute autre substance nutritive.

D'autre part, la bile paraît avoir une action particulière sur la virulence de certains bacilles, de la tuberculose en particulier, la modifiant, l'atténuant dans des proportions sensibles, à condition toutefois que la bile soit de même origine que le bacille; autrement dit, il est nécessaire d'employer de la bile humaine pour le bacille tuberculeux humain, bovine pour le bacille bovin, etc. (Calmette). On connaît les essais de vaccination très intéressants qui ont été obtenus par cette méthode (Calmette et Guérin) (1).

Mais, là encore, dans tous ces différents cas où l'action de la bile favorise nettement le développement des corps microbiens, sa présence dans la vésicule biliaire paraît être nuisible, car son action leucocytaire répulsive l'emporte de beaucoup sur l'action attirante leucocytaire provoquée par les bacilles.

Il en résulte que l'inoculation de vibrion cholérique, par exemple, dans la vésicule biliaire non vidée de son contenu, mais liée, ce qui constitue en réalité un ensemencement du vibrion cholérique avec de la bile, déterminera très rapidement la généralisation du vibrion dans l'organisme et pourra provoquer la mort, le milieu de culture étant particulièrement favorable, et rien n'entravant le développement.

Exemple : Lapin n° 57, inoculé le 21 octobre dans la vésicule biliaire suivant le mode habituel, avec une goutte de culture en eau peptonée de vibrion cholérique, âgée de 18 heures, à 37 degrés : 12 heures après l'inoculation, mort. A l'autopsie, peu de lésions; liquide péritonéal peu abondant, mais louche, contenant une proportion énorme de vibrions et de polynucléaires renfermant eux-mêmes des vibrions. La vésicule biliaire est aplatie, flasque, congestionnée, renfermant des

(1) *Annales de l'Institut Pasteur* et *C. R. de l'Académie des Sciences*, années 1907 à 1912.

placards de cellules muqueuses avec inclusion des vibrions.
Si l'on répète la même expérience, mais en ne liant point d'abord la vésicule, on obtient des résultats différents :

Exemple : Lapin n° 55, inoculé le 20 juillet intravésiculairement avec quelques gouttes d'eau peptonée contenant du vibrion cholérique. Le col vésiculaire n'est pas lié, et la bile est laissée.

Le taux agglutinatif est mesuré 5, 10, 15, 20 et 30 jours après l'opération. Primitivement de 1/10, il ne subit aucune variation et reste identique à ce qu'il était antérieurement.

Le 20 septembre, deux mois après l'inoculation, l'animal est de nouveau opéré ; sa vésicule est mise à nu. Son volume n'est pas modifié et son contenu, clair, a conservé sa teinte verdâtre. On retire, par ponctions, quelques gouttes du liquide : sur frottis, on voit des cellules épithéliales en petite quantité et point de vibrions cholériques. L'ensemencement de ce liquide en eau peptonée est cependant positif, et décèle la présence de vibrions.

On pose une ligature de soie sur le col, transformant ainsi la vésicule en cavité close; et on suture la paroi abdominale.

Vingt-quatre heures après, le vibrion cholérique a passé dans la circulation générale (ensemencement positif en eau peptonée de 1 centimètre cube de sang retiré par ponction intracardiaque).

Trente-six heures plus tard, l'animal est mort.

Il résulte de ces faits que le vibrion, contenu dans la vésicule biliaire libre et chargée de bile, pousse abondamment dans ce milieu.

Les évacuations intermittentes de tout le contenu étant fréquentes, les bactéries, au fur et à mesure de leur production, sont rejetées dans l'intestin, où elles ne peuvent causer, chez l'individu adulte, aucun phénomène morbide.

Au contraire, si la vésicule est liée à son col, les vibrions développés avec intensité dans cet excellent milieu, et ne pouvant se déverser dans l'intestin, se répandent dans la circulation générale.

En un mot, que la bile ait une action favorable ou nuisible sur les bactéries, cette action restera toujours minime en regard

de celle beaucoup plus importante qu'elle présente vis-à-vis des leucocytes.

Et quoiqu'il soit très probable que, dans certains cas (nous avons en vue le bacille tuberculeux), la bile bien employée, pourrait, en imprégnant seulement les bacilles laissés quelque temps en contact avec elle et lavés ensuite, être un adjuvant utile, il paraît nécessaire, dans toutes les inoculations intra-vésiculaires, de vider totalement le contenu biliaire. Par les lavages successifs, à l'eau physiologique et mieux à l'eau légèrement alcalinisée qui a la propriété de dissoudre les éléments biliaires et la mucine, on obtiendra une poche dans laquelle on inoculera les bacilles en cultures pures et non modifiées par le milieu.

(*A suivre.*)

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE JUIN 1912 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'INDOL SUR LES SCLÉROSES

par M. S. DRATCHINSKI

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

(Avec les Pl. VI à XI.)

L'étude expérimentale de l'action physiologique de l'indol et de ses dérivés sur l'organisme animal présente un grand intérêt, tant au point de vue théorique qu'au point de vue pratique.

Presque du premier moment de la vie de l'animal jusqu'à sa mort, un processus de putréfaction intestinale dû à l'action de la flore microbienne s'accomplit dans son intestin ; parmi les produits de putréfaction qui se forment sans cesse, à côté d'autres dérivés de la série aromatique, apparaît aussi l'indol. Ce produit de l'activité vitale de la flore intestinale, sans cesse formé et sans cesse absorbé, se transforme dans le foie en indoxylsulfate et en indoxylglycuronate, circule sous cette forme (et peut-être sous forme d'autres modifications) et est éliminé par l'organisme dans l'urine.

L'organisme n'en souffre-t-il pas?

En posant ce problème, ou le problème de la toxicité de l'indol, nous abordons forcément le problème plus général de l'autointoxication intestinale due à l'action de la flore microbienne, le facteur qui joue, d'après la théorie de Metchnikoff, un rôle prédominant dans l'usure, dans le vieillissement

de l'organisme en général et dans la sénilité précoce en particulier.

On comprend ainsi l'intérêt théorique qui se rattache à la solution du problème de la toxicité et de la non-toxicité de l'indol.

Metchnikoff a aussi indiqué les moyens pratiques de la lutte contre l'autointoxication intestinale, en préconisant la transformation de la flore sauvage nuisible pour l'organisme en une flore artificielle utile. L'introduction des microbes utiles dans l'intestin (bacilles lactiques, surtout bac. bulgare) crée des conditions qui réduisent au minimum l'action de la flore sauvage.

Le problème de la toxicité de l'indol présente donc aussi un grand intérêt pratique; si l'indol est un des produits de la putréfaction intestinale jouant un rôle dans l'autointoxication, l'abondance de l'indoxyl dans l'urine nous donnera des indications pratiques pour la lutte contre l'effet désastreux de l'empoisonnement ininterrompu de l'organisme, l'introduction des microbes utiles ou l'utilisation des régimes alimentaires spéciaux pouvant éliminer ce facteur toxique, qui apparaît principalement, sinon uniquement, grâce à l'absorption intestinale de l'indol, de provenance microbienne.

Bien que l'indol ait été découvert par Baeyer (3) en 1868 et qu'il ait été trouvé par Brieger (4) en 1877 dans les matières fécales de l'homme, le problème de la toxicité de l'indol attend toujours sa solution.

Un examen, même superficiel, de la bibliographie nous montre que les mêmes documents cliniques et expérimentaux ont donné naissance à des opinions radicalement contradictoires : les uns affirment, les autres nient la toxicité de l'indol; les deux opinions s'appuient sur les résultats obtenus dans l'étude de l'action aiguë de ce produit.

Herter (5) a observé chez des animaux à sang chaud, après l'injection intraveineuse de 50-100 cent. cubes et plus d'indol à 0,1 p. 100, les phénomènes suivants : une influence toxique sur le système nerveux, un affaiblissement de l'activité du cœur et des organes de respiration, un rétrécissement notable des pupilles, des convulsions cloniques irrégulières et un affaiblissement de la sensibilité réflexe. Chez l'homme qui recevait par voie buccale 0,025-2 grammes d'indol par jour, le même auteur

a constaté un état un peu agité pendant le sommeil, du mal de tête, des phénomènes accentués de faiblesse, des symptômes de neurasthénie, sans autres symptômes d'empoisonnement. L'auteur croit pouvoir tirer de ce fait la conclusion que les symptômes prodromaux de la neurasthénie peuvent avoir pour cause l'intoxication par l'indol de provenance intestinale.

Les observations faites sur des aliénés ont amené Lewis C. Bruce (6) à la conclusion qu'il existe un lien entre l'abondance de l'indoxyle dans l'urine et les états de dépression, et qu'il faut considérer l'indoxyle comme la cause principale de l'aliénation mentale.

Pardo (7), qui a observé 118 cas d'aliénation mentale, n'est pas aussi catégorique que l'auteur précédent, mais il croit que l'indol peut avoir une influence sur les troubles mentaux.

Cette hypothèse a cependant aussi des adversaires. Omorokoff (8), en se basant sur des documents cliniques, arrive à la conclusion que « l'indoxyle ne fait qu'accompagner les maladies mentales, surtout dans les psychoses dépressives et maniacales » et « qu'il n'y a pas de relation causale entre l'indoxyle et les troubles mentaux; il n'y a qu'un parallélisme ».

Ch. Hervieux (9), dans des expériences sur des animaux divers, surtout sur des chiens, faisait ingérer à ces animaux 2, 3 et même 5 grammes d'indol; n'ayant pas constaté de phénomènes d'intoxication, l'auteur dit que ces expériences « démontrent d'une façon absolue que non seulement l'indol et le scatol, mais aussi les autres composés de la même série sont dépourvus de toxicité ».

Baumann et Brieger (10) ont fait ingérer à un chien de 24 kilogrammes, en cinq jours, 18 grammes d'indol, sans avoir provoqué un seul phénomène d'empoisonnement, tandis que, dans l'expérience de Nencki (11), 2 grammes ingérés ont provoqué chez un chien de l'hématurie et de la diarrhée.

Une injection sous-cutanée de 1,5-2 grammes d'indol provoque, d'après Rovighi (12), la mort des lapins; 1 gr. suffit pour le cobaye. La mort est précédée par les phénomènes suivants : somnolence, rétention de l'urine et des matières, affaiblissement de l'activité du cœur et hypothermie.

Ces expériences plaident contre l'opinion de Ch. Hervieux (9); elles montrent que de grandes doses d'indol sont, non seu-

lement toxiques, mais capables même de tuer des animaux de laboratoire.

Kukula (13) ne veut pas tirer des travaux cités cette conclusion, qu'imposent les expériences, et affirme qu'en cas d'intoxication intestinale l'indol ne joue aucun rôle (*dass das Indol bei Autointoxicationen infolge von Ileusk eine Rolle spielt*). Porcher et Hervieux (14) ne font que répéter sous une autre forme l'opinion de Kukula lorsqu'ils affirment que « l'indol et le scatol ne doivent pas être compris parmi les facteurs de la toxicité des produits de la digestion intestinale » ; les auteurs se basent sur les expériences dans lesquelles les animaux supportaient bien l'indol introduit par voie buccale à des doses de 1 gr. 2 et 2 gr. 5. Ch. Hervieux (16) arrive ainsi à la conclusion que « l'*indol est le témoin de la formation des produits toxiques développés au cours de putréfactions* ».

Telles étaient les opinions sur la toxicité de l'indol et des autres dérivés de la série aromatique qui dominaient dans la science presque jusqu'à ces derniers jours, lorsque Metchnikoff, dans son travail : « Poisons intestinaux et scléroses » (*Ann. de l'Institut Pasteur*, octobre 1910), a jeté une lumière nouvelle sur ce problème.

D'après Metchnikoff, il s'agit de savoir si les substances de la série aromatique, élaborées en quantités minimes par la flore microbienne, ne peuvent pas occasionner une intoxication chronique qui ne se manifeste pas par des phénomènes visibles. C'est de ce point de vue qu'il faut aborder l'étude expérimentale du problème. « Etant donné que les bactéries intestinales ne produisent, en somme, que de petites doses de corps de la série aromatique, dit Metchnikoff, leur influence sur l'organisme ne pourrait se manifester que sous forme d'intoxication chronique. »

Les expériences avec le paracrésol, faites sur des lapins, amènent Metchnikoff à la conclusion « que les phénols, en cumulant leur action pendant plusieurs mois, sont réellement capables de provoquer l'artériosclérose chez le lapin ». Dans ces expériences, dans lesquelles 36 lapins reçurent par voie buccale 0,04 grammes de paracrésol en solution aqueuse durant une période de un à quatre mois, 22 (61 p. 100) ont présenté

des plaques athéromateuses, avec dépôt calcaire dans la tunique moyenne dans la plupart des cas.

Si, dans les expériences analogues, faites sur des cobayes, on n'a pas constaté d'altérations dans l'aorte, les coupes du foie montraient d'une façon indiscutable les premières phases des foyers de cirrhose. Des foyers analogues ont été constatés dans le foie d'un singe; cet animal présentait aussi de la rigidité et de l'épaississement des vaisseaux ainsi que de la sclérose des artères rénales. Dans le même travail, Metchnikoff (15) résume aussi les résultats des expériences du regretté Ohkoubo (1), qui a étudié dans son laboratoire l'action de l'indol et du scatol. D'après Ohkoubo, l'indol provoque chez les lapins une dégénérescence athéromateuse des parois de l'aorte, une infiltration des espaces péri-vasculaires par des cellules mononucléaires, avec une hypertrophie consécutive du tissu fibreux dans le foie du cobaye, et les mêmes changements moins accentués dans les reins. Tous ces résultats amènent Metchnikoff à la conclusion suivante : « On ne peut plus mettre en doute ce fait fondamental que de petites doses de paracrésol et d'indol, accumulant leur action sur l'organisme pendant un temps plus ou moins long, sont capables d'amener des lésions chroniques se traduisant par des phénomènes de sclérose. Ce sont précisément les lésions que l'on rencontre si fréquemment dans la vieillesse. »

De ce nouveau point de vue, l'étude de l'action des substances de la série aromatique prend un intérêt considérable, parce que la toxicité de ces substances peut, non seulement élucider le problème de la vieillesse et les changements intimes opérés dans les tissus d'un âge avancé, mais jeter aussi une lumière nouvelle sur l'étiologie de l'artériosclérose, cet important problème qui attend encore son explication complète.

Ayant abordé, sur la proposition de Metchnikoff, l'étude expérimentale du rôle de l'indol dans la sclérose, nous devions aussi tenir compte de son action toxique aiguë. Il fallait, d'un côté, fixer une dose considérablement inférieure à la dose toxique qui provoque les phénomènes visibles de l'intoxica-

(1) Le travail de Ohkoubo n'a pu être publié parce qu'il n'a pas laissé de manuscrit.

tion; d'un autre côté, il fallait connaître les symptômes de l'intoxication aiguë afin de pouvoir, au cours des expériences de longue durée avec de petites doses, exclure les phénomènes toxiques.

Citons quelques exemples parmi les expériences que nous avons répétées plusieurs fois sur des cobayes; nous avons fait des injections intrapéritonéales et sous-cutanées, l'indol a été aussi introduit par voie buccale.

Un cobaye de 660 grammes reçoit une injection intrapéritonéale de 0 gr. 25 d'indol dissout dans 1,5 cent. cube d'huile d'olive. 3-5 minutes après l'injection, on observe une trépidation par secousses de tout le corps, ensuite une trépidation périodique de groupes musculaires isolés et une faiblesse du train postérieur. 15-20 minutes après, la trépidation du corps ne s'interrompt plus, la parésie des pattes postérieures s'accentue, l'animal les traîne dans ses déplacements, il tombe sur le côté et conserve avec difficulté l'assiette normale. Bientôt il tombe et ne peut plus se relever. La trépidation ininterrompue devient toujours plus forte; de temps en temps, il y a des convulsions; en général, cette crise fait l'impression d'un fort frisson ininterrompu de fièvre. L'activité du cœur et des organes respiratoires se ralentit. La température rectale, qui était, avant le commencement de l'expérience, de 38°3, tombe une heure après jusqu'à 36°8 centigrades. Deux heures après, la trépidation et les convulsions deviennent peu à peu plus faibles; la paralysie de toutes les extrémités persiste; la piqûre de la peau ne provoque pas de réaction; absence complète du réflexe oculaire; on entend à peine le battement du cœur; la respiration est superficielle: enfin, l'animal tombe dans un coma complet. Cette crise d'intoxication aiguë a duré trois heures et demie et a entraîné la mort. La rigidité cadavérique ne s'est pas fait attendre longtemps.

Autopsie. — Les vaisseaux sont remplis de sang; celui-ci est fluide, foncé et rougit à l'air; le cœur est fortement dilaté par le sang non coagulé. Dans le péritoine, il y a une petite quantité d'huile. Celle-ci, recueillie par une pipette et mélangée avec de l'eau physiologique, a donné, avec le réactif d'Ehrlich (p. diméthylaminobenzaldéhyde), la réaction de l'indol d'une façon très nette.

Il faut encore indiquer que, dans toutes les méthodes de détermination de la dose toxique aiguë, l'indol a été dissous dans l'huile et que les symptômes de l'empoisonnement et les résultats de l'autopsie étaient toujours analogues à ceux que nous venons de décrire; les résultats essentiels de toutes les autres expériences sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Ajoutons encore que la crise d'intoxication n'entraîne pas

toujours la mort; dans ce cas, les phénomènes d'intoxication, après avoir atteint le maximum, deviennent peu à peu plus faibles, la température remonte, les battements du cœur et la respiration reprennent leur rythme habituel, et l'animal, après avoir fait quelques essais, se lève et se jette sur la nourriture.

Chez le cobaye 4, à l'endroit de l'injection, le tissu souscutané était gonflé et imbibé d'huile contenant l'indol (constaté avec le réactif d'Ehrlich).

NUMÉROS des cobayes.	POIDS des cobayes en grammes.	MÉTHODE de l'introduction de l'indol.	QUANTITÉ D'INDOL introduite.	LA CRISE commence dans un délai de :	DURÉE de la crise.	ISSUE de la crise.	DOSE MORTELLE sur cobayes du poids de 100 grammes.	DOSE toxique provoquant des phénomènes visibles sur cobayes du poids de 100 gr.
1	660	Intrapér.	0,25	3-5 min.	34 m. 1/2	Mort.	0,038	
2	330	Id.	0,5	Id.	15 min.	Id.	0.16	
3	310	Id.	0,05	Id.	14 h. 1/2	Guérison.		0,016
4	350	Sous-cut.	0,5	28-30 min.	6 heures.	Mort.	0,15	
5	300	Id.	0.2	30 min.	2 heures.	Guérison.		0,07
6	130	*per os.*	0,5	1 h. 1/2	3 h. 1/2	Mort.	0.38	
7	120	Id.	0,25	1 h. 3/4	2 heures.	Guérison.		0,19
				après l'introduction de l'indol.				

A l'autopsie du cobaye 6, plusieurs hémorragies de la grandeur d'un grain de lentille ont été trouvées; la couche supérieure épithéliale de la muqueuse de l'estomac est d'une couleur blanc grisâtre opaque et se détache facilement. Le contenu de l'estomac et de l'intestin dégageait une forte odeur d'indol.

Dans les séries d'expériences 6 et 7 on a pris, pour la réaction d'Ehrlich, le sérum et le sang de la veine jugulaire pendant le paroxysme de la crise ; le résultat était positif pour les doses mortelles et négatif pour les doses visiblement toxiques.

Nous avons indiqué dans notre tableau les doses mortelles et toxiques; mais si nous examinons les faits de plus près, la question se pose de savoir si nos chiffres correspondent exactement à la réalité. Nous avons vu, en effet, que l'huile que l'on trouve dans le tissu sous-cutané et dans le péritoine donne la réaction de l'indol; nous savons aussi que le contenu de l'estomac et des intestins des animaux auxquels on fait ingérer l'indol dégage une forte odeur d'indol. Supposons, en effet, que les phénomènes d'intoxication apparaissent lorsque l'intestin a absorbé *a* grammes d'indol. Nos expériences prouvent que les phénomènes d'intoxication apparaissent d'autant plus vite que l'indol est absorbé plus vite : dans le cas d'injection intrapéritonéale, ces phénomènes apparaissent presque aussitôt après l'injection; dans l'injection sous-cutanée, 15-20 minutes après; dans l'introduction par voie buccale, 1 h. 1/2-2 heures après; l'intervalle de 1 h. 1/2-2 heures dans le cas de l'absorption intestinale est évidemment nécessaire pour accumuler dans l'organisme la dose de *a* grammes, indispensable pour l'action toxique. Mais avant le commencement de la crise et pendant la crise, une partie de cette quantité hypothétique est éliminée sous forme de sulfates; c'est pourquoi il est évident que si la crise dure pendant un temps plus ou moins long, cette perte doit être remplacée aux dépens du surplus de l'indol introduit par voie buccale.

L'examen des faits cités nous mène ainsi à la conclusion que les doses indiquées dans notre tableau sont supérieures aux doses réellement toxiques.

Les résultats anatomo-pathologiques de l'intoxication aiguë seront communiqués plus tard.

Avant d'exposer les résultats des expériences sur l'intoxication chronique, nous voulons nous arrêter brièvement sur le but et les méthodes de nos recherches et sur la technique de nos expériences.

Le problème qui se posait, d'après les idées de Metchnikoff, était le suivant : quels changements s'accomplissent dans les tissus des différents organes, surtout dans l'aorte, si on introduit dans l'organisme animal de petites doses d'indol ne provoquant pas de phénomènes d'intoxication visibles? Afin d'imiter l'auto-intoxication naturelle de l'organisme, il fallait

introduire l'indol par voie buccale. Nous avons employé l'indol de « *Bad. Anilin u. Soda-Fabrik* ». Afin d'éliminer l'influence du dissolvant (de l'alcool, de l'éther, par exemple), nous avons pris comme dissolvant l'huile d'olive, comme l'ont déjà fait Ch. Hervieux (16) et Ohkoubo. On préparait la solution d'indol à 4 p. 100 *ex tempore*; chaque animal recevait 1 cent. cube de cette solution, c'est-à-dire 0 gr. 04 d'indol; on se servait de la seringue pour introduire l'indol dans la bouche, avec les précautions nécessaires.

Avant le commencement des expériences, on n'a pu, avec les réactions de Maillard ou d'Obermeyer, constater de traces d'indican dans l'urine.

Afin de ne pas interrompre le processus d'intoxication, il fallait introduire l'indol tous les jours, l'expérience nous ayant montré que la réaction sur l'indican, positive dans notre mode d'intoxication au bout de vingt-quatre heures, devient négative au bout de quarante-huit heures. Ce résultat concorde avec celui de E. Wang (17), qui a constaté, dans ses expériences sur le chien, que l'indol ajouté à la nourriture est complètement éliminé après vingt-quatre heures; d'après Grosser (18), il faut quarante-huit heures pour l'élimination complète. Nous ne voulons pas trancher ici cette question; disons seulement que si l'on fait ingérer l'indol tous les jours, la réaction de l'urine au point de vue de l'indican est nettement positive; malgré cela, on n'observe pas, au cours de l'expérience, de phénomènes d'intoxication tant soit peu manifestes.

On se servait pour l'examen microscopique des organes des animaux tués par le chloroforme ou saignés à blanc. On ensemençait avec le sang du cœur et avec les organes des milieux de culture stériles; les organes étaient soumis à un examen histologique seulement dans les cas où le sang et les organes étaient tout à fait stériles et où il n'y avait pas d'anomalies anatomo-pathologiques macroscopiques.

Nous avons employé comme fixateurs, pour les fragments d'organes, le sublimé, le liquide de Bouin, l'acétone, etc.; l'inclusion dans la paraffine se faisait d'après les méthodes ordinaires. Nous nous sommes servi de l'hématéine-éosine et du colorant de Van Gieson pour la coloration des coupes;

pour la coloration des fibres élastiques, du mélange de chaux-argent nitrique, d'après Weigert.

Avant d'exposer les résultats obtenus dans nos expériences sur l'intoxication chronique, nous avons à mentionner les recherches que nous avons faites pour étudier la structure de l'aorte des cobayes normaux, non soumis au régime de l'indol. Les résultats de cette étude présentent un intérêt au point de vue du problème général de la sclérose physiologique de l'aorte chez les rongeurs. Ils nous serviront aussi de base pour juger les résultats obtenus dans les expériences sur l'intoxication chronique.

D'après l'opinion courante, le système vasculaire des cobayes, surtout l'aorte, montre une résistance tout à fait particulière; on affirme que ce système n'aurait pas à souffrir de l'action des poisons vasculaires et que l'athérome spontané ne se rencontrerait que dans des cas excessivement rares.

Weinberg (19) a examiné 236 cobayes et n'a constaté qu'un seul cas de dégénérescence athéromateuse des parois de l'aorte.

Nos études confirment d'un côté l'opinion citée sur la résistance de l'aorte chez le cobaye : l'examen macroscopique ne nous a jamais révélé de plaques athéromateuses ni d'autres anomalies dans les parois de ce vaisseau; mais, d'un autre côté, l'examen microscopique systématique de la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules nous a donné des résultats qui ne plaident pas en faveur de la résistance particulière de l'aorte chez le cobaye.

Nous avons été amené à cette étude par les faits suivants :

M. Studzinski (20), qui travaillait en même temps que nous au laboratoire de Metchnikoff, a trouvé, après l'injection sous-cutanée de cultures vivantes du B. coli, durant une période de deux mois, plusieurs parties cartilagineuses près de la base de l'aorte (1). Bientôt après, nous avons aussi constaté des foyers cartilagineux chez un cobaye qui a été en expérience un mois et demi (0,04 grammes d'indol par jour). La durée de l'action de l'indol nous ayant paru trop courte pour attribuer à ce fac-

(1) M. Griasnow, qui a étudié l'influence du paracrésol sur l'artériosclérose, n'a pas encore publié ses résultats.

leur les changements constatés, nous avons entrepris l'examen systématique de l'aorte.

L'aorte, dans la région des valvules et un peu plus haut, ne présentait pas d'indications plaidant en faveur d'anomalies dans la paroi; ce n'est que dans des cas rares que le bord libre de la valvule montrait un épaississement d'aspect vitreux. C'est pourquoi il fallait faire des séries de coupes de toute cette partie de l'aorte, cette méthode seule permettant d'affirmer ou de nier avec certitude l'existence des altérations de la paroi.

Sur les premiers dix cobayes normaux, pesant 450-530 gr., 8 avaient des foyers cartilagineux dans la paroi de l'aorte. Cette constatation inattendue posait la question de savoir s'il ne s'agit pas ici d'un détail anatomique normal, question d'autant plus justifiée que les grands animaux ont, dans cette région, non seulement des cartilages, mais aussi des os. Le cartilage (*cartilago cordis*) se trouvant dans le cercle fibreux de l'orifice de l'aorte du cheval, devient osseux chez les vieux animaux; un cartilage semblable se trouve toujours chez le porc et pas toujours chez les carnivores; les animaux à cornes ont deux os dans le cœur (*ossa cordis*).

Une étude plus approfondie nous a fourni une réponse négative à la question posée. L'examen microscopique des séries de coupes transversales a montré que ces parties cartilagineuses ne sont pas réparties d'une façon régulière ni dans le plan transversal de l'aorte, ni le long de l'aorte (de la base de l'aorte jusqu'au bord supérieur libre des valvules). On trouve souvent des parties cartilagineuses, de forme arrondie ou en triangle aux angles arrondis, dans la conjonctive qui rattache les valvules à la paroi de l'aorte (Pl. I, fig. 1). Ces parties cartilagineuses se trouvent tantôt dans les trois attaches conjonctives simultanément, tantôt dans une ou deux de ces attaches; ces variations ne montrent aucune régularité ni sur les coupes de la même partie de l'aorte, ni sur les coupes des animaux différents. On trouve non moins souvent des foyers cartilagineux de forme ronde ou ovale dans la partie de la paroi de l'aorte comprise entre les lieux d'insertion des attaches des valvules (Pl. I, fig. 2-3); on n'a pas constaté de relation entre ces foyers et ceux qui se trouvent à la base des valvules. Ajoutons que les foyers ne sont pas localisés d'une façon déter-

minée dans les tuniques; ils se rencontrent seulement plus souvent dans la tunique moyenne que dans la tunique adventive.

Les foyers ovales ou ronds varient aussi dans leur grandeur, ce que l'on constate déjà en examinant l'épaisseur de la paroi de l'aorte; tantôt les tuniques intérieure et extérieure de l'aorte ne dépassent pas, quant à leur épaisseur, l'épaisseur normale de la paroi (Pl. VI, fig. 1), tantôt elles la dépassent légèrement (Pl. VI, fig. 2); tantôt la tunique moyenne avec l'intima s'épaississent fortement et envahissent en partie la lumière du vaisseau (Pl. VI, fig. 1). Les foyers cartilagineux sont tantôt isolés, tantôt réunis et imprègnent toute la paroi de l'aorte entre les attaches des valvules. Comme particularité, il faut citer un cas anormal où il y avait quatre valvules dans l'aorte : la cloison divisant la valvule moyenne a été fortement dilatée par les deux foyers qu'elle contenait; dans deux cas où la cartilagination de l'aorte était abondante, on a pu observer des figures de mitose des noyaux des cellules cartilagineuses.

Toutes les constatations précédentes démontrent suffisamment que les foyers cartilagineux ne peuvent pas être considérés comme un caractère anatomique normal.

En poursuivant l'examen de toute une série de coupes dans tous les détails, on peut faire la constatation suivante : dans un endroit quelconque de la paroi de l'aorte (principalement sur la tunique moyenne et sur la tunique adventive) apparaissent des cellules arrondies, à noyau rond, nettement délimité; en s'accumulant peu à peu entre les fibres élastiques, ces cellules forment des foyers arrondis; les espaces intercellulaires se colorent bien à l'hématéine; les cellules se trouvant au centre de ces foyers deviennent plus grandes et prennent la forme et l'aspect des cellules cartilagineuses typiques; tout le foyer prend l'aspect d'une partie cartilagineuse, les petites cellules rondes ne restent que sur la périphérie ou sur le tissu avoisinant (Pl. VI, fig. 3).

Nous avons ainsi, dans les cas examinés, un processus pathologique; une sclérose de l'aorte *sui generis*, se manifestant par un processus de cartilagination de l'aorte, soit en foyers, soit sous une autre forme.

Nous disons processus *sui generis*, parce que la cartilagina-

tion de l'aorte chez l'homme et chez certains animaux ne se rencontre pas avec cette constance, qui est caractéristique pour le cobaye, et, comme nous le verrons plus tard, aussi pour d'autres rongeurs.

Si développé qu'il soit, le processus de cartilagination ne frappe qu'avec une rareté extrême la tunique adventive; nous n'avons trouvé qu'une seule fois un faible épaississement de l'intima (Pl. VI, fig. 3).

Nous avons examiné en tout :

NOMBRE de cobayes examinés.	POIDS OU AGE	NOMBRE DE CAS de cartilagination.	POURCENTAGE
4	embryons quelques jours avant la naissance.	0	0
4	2 semaines.	0	0
6	120-220 grammes.	0	0
10	250-300 —	3	30 p. 100
8	350-450 —	4	60 —
10	450-530 —	8	80 —
6	545-630 —	6	100 —
6	650-740 —	6	100 —
54		27	50 p. 100

Il est plus juste, lorsqu'on fait la totalisation, de ne compter que les cobayes ayant un poids de 250 grammes et plus; on a alors le résultat suivant : 27 cas de cartilagination sur 40 animaux examinés, ou 67,5 p. 100.

Nous ne voulons pas, étant donné le nombre encore peu considérable des cas étudiés, établir une loi de fréquence de la cartilagination chez les cobayes normaux, mais nous pouvons certainement conclure que la dégénérescence cartilagineuse est très fréquente chez les cobayes et que sa fréquence augmente avec l'augmentation du poids des animaux.

Le poids dépendant surtout de l'âge, nous avons le droit d'affirmer que le processus pathologique constaté peut être considéré comme une maladie de l'âge. S'il en est ainsi, on pouvait supposer *a priori* qu'avec l'augmentation de l'âge, les foyers cartilagineux peuvent subir des processus de dégénération

avec le dépôt consécutif des sels calcaires. Nous n'avons constaté que dans deux cas (2 cobayes pesant 610 et 715 gr.) les phases primaires du dépôt des sels calcaires dans les espaces intercellulaires des foyers cartilagineux.

Quelle est l'étiologie de cette maladie?

Il est difficile de donner actuellement une réponse catégorique. Si l'étiologie de l'artériosclérose chez l'homme n'est pas encore complètement élucidée, ce problème demande une étude encore plus détaillée lorsqu'il s'agit des animaux. Tous les facteurs de l'artériosclérose chez l'homme, comme la syphilis, l'alcoolisme, l'empoisonnement par la nicotine, par les sels de plomb, etc., ne peuvent évidemment jouer aucun rôle chez nos cobayes. Il faut aussi éliminer les processus infectieux, l'autopsie ne nous en ayant pas révélé de traces. Cela posé, il ne reste à notre avis qu'à interpréter les processus décrits dans l'aorte du cobaye, d'après les idées de Metchnikoff; il faut chercher le moment étiologique dans l'autointoxication intestinale de provenance microbienne, dont les effets désastreux deviennent plus graves à mesure que l'animal vieillit et peuvent provoquer une série de changements caractéristiques pour l'usure de l'organisme.

Nous avons tenté d'abord de prouver notre supposition d'une façon indirecte. Les conditions de digestion qui entraînent habituellement un processus de putréfaction intense dans l'intestin étant les mêmes chez tous les rongeurs, et l'autointoxication intestinale étant considérée comme le moment étiologique de la sclérose du cobaye, on devait aussi constater le même processus pathologique chez les autres rongeurs.

L'examen microscopique de l'aorte des souris blanches nous a en effet révélé un processus de cartilagination analogue à celui que nous avons décrit chez les cobayes.

Mais, peut-on nous objecter, ce sont les conditions spéciales de la vie en captivité qui provoquent l'anomalie pathologique dans les vaisseaux. C'est pourquoi nous avons étudié aussi la structure de l'aorte chez des animaux vivant en liberté, tels que des rats d'égouts; et nous avons trouvé chez de vieux rats le même processus de cartilagination dans la paroi de l'aorte, dans la région des valvules.

Voici maintenant les résultats des expériences d'intoxication

chronique des singes et des cobayes avec l'indol. De trois singes, un seulement a supporté l'expérience jusqu'au bout, c'était un *Macacus Rhesus* femelle ; des deux autres, l'un est mort de tuberculose pulmonaire, l'autre d'une inflammation aiguë de l'intestin. L'animal qui nous intéresse était jeune et pesait 2.200 grammes. Durant huit mois, il a reçu tous les jours, par voie buccale, 0,04 grammes d'indol dissous dans l'huile d'olive (en tout, 10 gr. 4 d'indol). La réaction de l'indican était faite presque tous les jours, le résultat était nettement positif. On n'a pas observé de phénomènes d'intoxication visibles pendant la durée de l'expérience. Lorsque, après huit mois, l'animal a été sacrifié (saigné à blanc), il pesait 3.100, il avait donc augmenté de 900 grammes. L'autopsie n'a pas révélé de changements pathologiques. Les milieux de culture, ensemencés avec le sang et les organes, sont restés stériles. L'examen microscopique a donné les résultats suivants :

Aorte. — Sur les coupes transversales de la base de l'aorte, autour des *vasa vasorum*, des infiltrations de cellules rondes ; infiltrations semblables dans les espaces entre les fibres musculaires du cœur, en contiguïté avec l'adventice de la base de l'aorte.

Foie. — Sur les coupes, une infiltration faible de petites cellules autour des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins.

Reins. — Chaque coupe montre d'une façon nette des phénomènes de néphrite interstitielle. En plusieurs endroits de la couche corticale ainsi que de la couche médullaire, il y a des foyers considérables formés par de petites cellules rondes ; les coupes transversales des tubes urinifères apparaissent comme des îlots sur le fond de ces infiltrations (Pl. VII, fig. 1) ; des infiltrations semblables enveloppent aussi les glomérules, tantôt de tous côtés (Pl. VII, fig. 3), tantôt d'un côté seulement (Pl. VII, fig. 2). Mais ici nous n'avons pas seulement devant nous les phases primaires de la sclérose, les coupes montrent toutes les phases, depuis l'infiltration par de petites cellules rondes jusqu'à la formation du tissu conjonctif ; celui-ci peut former des bandes assez larges qui entourent les glomérules en partie fortement ratatinés, en partie détruits (Pl. VIII, fig. 1). On constate les mêmes phénomènes autour des tubes urinifères.

Autour des vaisseaux, infiltration non moins abondante par

de petites cellules rondes (Pl. VIII, fig. 2), avec prolifération consécutive du tissu conjonctif en contiguïté avec les vaisseaux.

Capsules surrénales. — Les coupes transversales de la capsule montrent d'une façon très nette une forte prolifération du tissu conjonctif dans la substance corticale ; dans la couche réticulaire, on constate une grande quantité de foyers calcaires. Le tissu conjonctif se dirige, sous forme de bandes larges, vers la périphérie de la glande, les bandes deviennent de moins en moins larges à mesure qu'elles se rapprochent de la périphérie ; prenant naissance presque sur la limite de la substance médullaire et de la couche réticulaire de la substance corticale, elles occupent presque les trois quarts de cette substance. Par endroits, prolifération du tissu conjonctif. Des lacets de tissu conjonctif se détachent de nombreux petits îlots de cellules fortement déformées, à noyaux picnotiques (Pl. IX, fig. 1).

On pouvait compter sur chaque coupe jusqu'à vingt parties calcaires, et même davantage, de forme arrondie ou irrégulière avec une disposition concentrique de couches de chaux ; la répartition en couches concentriques ne présente pas la même régularité dans tous les foyers. Sur les coupes décalcifiées, la couche périphérique de ces foyers est formée par des fibres du tissu conjonctif montrant une dégénérescence hyaline et se dirigeant vers le centre. On trouve quelquefois, dans le centre de ces foyers, des restes de cellules.

Cerveau. — Légère prolifération des cellules névrogliques, et neuronophagie nette. M. Wladytchko (21) a observé le même phénomène chez le cobaye ayant subi l'intoxication par de petites doses d'indol.

Une intoxication par de petites doses d'indol, d'une durée de 8 mois, a provoqué ainsi chez le singe des changements ayant un caractère scléreux : dans le cerveau, dans le foie, dans l'aorte, les phases primaires de la sclérose ; dans les reins et les capsules surrénales, les phases primaires avec la prolifération consécutive du tissu conjonctif.

Ces phénomènes peuvent-ils être expliqués par coïncidence accidentelle, ou par la vie en captivité ?

Nous reviendrons sur la première objection, lorsque nous aurons à discuter les résultats de nos expériences sur le cobaye ; la seconde objection tombe parce qu'un singe de la même espèce

et du même poids à peu près (2.850 gr.), tenu en cage durant presque la même période de 8 mois, ne nous a révélé, à l'examen histologique, pas même des traces de phénomènes semblables.

Les expériences sur l'intoxication chronique du cobaye nous ont donné des résultats non moins intéressants. De 25 cobayes auxquels on faisait ingérer tous les jours 0 gr. 04 d'indol, 14 seulement peuvent compter pour nos résultats ; les autres n'ont pas été pris en considération pour diverses causes : six ont péri accidentellement ; chez un cobaye sacrifié, le sang du cœur n'a pas été stérile ; dans deux cas où les animaux furent sacrifiés 1 mois 1/2 et 2 mois après le commencement des expériences, la durée de l'intoxication était trop courte.

Avant le commencement de l'expérience, le poids des 12 cobayes dont nous tenons compte était de 360-480 grammes ; l'augmentation ou la diminution du poids à la fin de l'expérience n'a pas dépassé 70 grammes dans tous ces cas. Deux cobayes mis au monde par une femelle soumise à nos expériences ont été pris pour le régime à l'indol lorsqu'ils n'avaient que deux semaines ; après la période de 8 mois d'intoxication chronique (0 gr. 04 d'indol par voie buccale tous les jours), ils ne pesaient que 210 et 230 grammes. La durée de l'expérience dans les autres cas a été de 4 à 10 mois (2 cobayes, 4 mois ; 2 — 4 mois 1/2 ; 2 —, 5 mois ; 2 —, 6 mois ; 1 —, 6 mois 1/2 ; 1 —, 7 mois 1/2 ; 2 —, 8 mois ; 2 —, 10 mois 1/2). On n'a pas observé de phénomènes d'intoxication visibles pendant la durée de l'expérience. A l'autopsie des cobayes sacrifiés (chloroformés ou saignés), pas de changements pathologiques ; des milieux de culture ensemencés avec ce sang sont restés stériles.

L'examen microscopique des séries de coupes a montré les changements histologiques suivants :

Aorte. — Sur les coupes transversales de la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules, autour des *vasa vasorum* passant dans le tissu adventice, il y a des infiltrations de petites cellules rondes, mononucléaires ; les polynucléaires sont excessivement rares ; par endroits, des foyers de tissu conjonctif couvrent complètement les fibres élastiques dans la paroi. On trouve aussi dans la tunique moyenne des foyers allongés de dégénérescence hyaline, ayant

la forme d'un ovale comprimé, ou de forme irrégulière ; la plupart ou la moitié de ces foyers sont imprégnés de sels calcaires ; des restes de cellules sont disséminés dans les parties non imprégnées de sels calcaires (Pl. X, fig. 1, cobaye 15, 5 mois sous l'expérience). Des foyers semblables, prenant naissance au bord extérieur de la paroi, traversent obliquement la tunique moyenne, se heurtant presque à l'intima (Pl. X, fig. 2, cobaye 3, 6 mois en expérience) ou se localisent dans ce bord de la paroi (Pl. XI, fig. *a* et *c*). Les foyers calcaires présentent des variations sensibles dans leur grandeur. On le voit dans les figures *c*, *a*, *e* et *d*, Pl. XI.

Ces foyers, comme nous avons pu nous en convaincre par l'examen d'une série de coupes, ne présentent pas les caractères d'une dégénérescence hyaline des foyers cartilagineux avec dépôt consécutif des sels calcaires ; nous n'avons pu trouver ces caractères dans les restes des cellules. Nous avons constaté des foyers semblables dans quatre cas. On trouve encore des foyers calcifiés dont la périphérie n'a pas de parties de dégénérescence hyaline non imprégnée. Dans ces dépôts calcaires, on peut quelquefois constater des restes de cellules à aspect cartilagineux ; lorsqu'un foyer semblable se trouve à côté des foyers cartilagineux, on est forcément amené à supposer que le foyer calcaire présente une dégénérescence calcaire du foyer cartilagineux (Pl. X, fig. 3 *a*, cobaye 1, 6 mois 1/2 sous l'expérience). Deux cobayes ont présenté des foyers semblables. Enfin, dans deux cas, nous avons eu simultanément les foyers calcaires de ces deux aspects différents (Pl. XI). Si avancée qu'elle soit, cette dégénérescence calcaire n'entraîne jamais l'épaississement de l'intima.

De 14, ou, pour mieux dire, de 12 cobayes (deux aortes des cobayes ayant subi l'expérience pendant 10 mois ont été malheureusement égarées), 8 présentaient des changements semblables de l'aorte. Les deux jeunes cobayes (cf. p. 417) ont présenté des foyers avec une forte cartilagination de la paroi de l'aorte dans la région des valvules.

Reins. — Des foyers, nettement déterminés, d'infiltration par des cellules rondes mononucléaires ont été trouvés dans les coupes de reins de tous les cobayes ; les polynucléaires sont excessivement rares ; infiltrations semblables entre les tubes

urinifères autour des glomérules et des vaisseaux ; dans la plupart des cas, prolifération consécutive du tissu conjonctif et destruction des glomérules. On voit ainsi que ce sont les mêmes phénomènes qui ont été constatés chez le singe ; c'est pourquoi nous pouvons nous rapporter, quant à l'aspect microscopique, aux figures données pour le singe.

Nous avons aussi constaté presque dans tous les cas des dépôts calcaires dans les tubes urinifères. Ces dépôts calcaires coïncidaient avec la calcification de la paroi de l'aorte. Ayant constaté cette coïncidence, nous nous sommes mis à préparer, par un procédé rapide, des coupes de reins (fixation dans l'acétone 1 heure, xylol 10-15 minutes ; paraffine 56 degrés, 1 heure, etc.); les dépôts calcaires dans les tubes une fois constatés, nous étions sûrs de trouver les foyers calcifiés dans l'aorte. Cette supposition ne s'est pas confirmée dans deux cas se rapportant aux aortes de jeunes cobayes ; ceux-ci, comme on l'a indiqué plus haut, ne présentaient que des foyers cartilagineux dans leurs aortes.

Foie. — Les coupes du foie présentent la phase primaire de la cirrhose sous forme d'une infiltration de petites cellules autour des vaisseaux biliaires et sanguins; ce phénomène se manifeste chez tous les cobayes d'une manière légère.

La constance avec laquelle ces changements pathologiques se rencontrent chez presque tous les animaux soumis à l'expérience, doit exclure toute supposition d'une coïncidence accidentelle. L'examen de cinq cobayes de contrôle, ayant subi le régime de captivité durant la même période de 8 mois, ne nous a pas révélé de processus pathologiques analogues à ceux que nous avons décrits ; la captivité, comme on le voit, ne peut pas être considérée comme la cause de ces phénomènes.

L'intoxication chronique par l'indol a donc provoqué chez le cobaye les phénomènes caractéristiques de la sclérose : la sclérose typique des reins, la phase primaire de cirrhose du foie et l'athérome spécifique de l'aorte dans la région des valvules. L'athérome se manifestant chez le cobaye par le processus de dégénérescence hyaline (sous forme de foyers) de la paroi de l'aorte, avec le dépôt consécutif de sels calcaires, a été constatée dans 8 cas sur 12, tandis que, parmi les 52 cobayes normaux examinés par nous, deux seulement présentaient les

phases primaires de calcification des foyers cartilagineux, mais ces deux animaux étaient d'un poids très élevé (610 et 715 grammes). Ces deux cas de dégénérescence calcaire de l'aorte des cobayes normaux renforcent notre opinion, que l'athérome de l'aorte constatée chez le cobaye dans nos expériences, est due à l'intoxication chronique par l'indol, introduit en petites doses par voie buccale ; c'est pourquoi l'indol doit être compris, non seulement parmi les poisons intestinaux qui occasionnent les processus caractéristiques de la vieillesse, mais aussi parmi les substances qui provoquent les processus pathologiques dans la paroi de l'aorte.

Loin de nous la pensée de considérer les résultats de nos recherches sur les effets de l'intoxication chronique par l'indol comme la solution intégrale de ce problème ; mais nous croyons que notre travail a donné des résultats encourageants pour le résoudre et que ces résultats s'accordent avec la conclusion de Metchnikoff, citée plus haut (p. 405).

Nous pouvons résumer les résultats de notre travail de la manière suivante :

1° Des doses plus ou moins grandes d'indol provoquent chez le cobaye des crises d'intoxication aiguë se manifestant par des phénomènes neuro-musculaires pouvant avoir une issue mortelle, mais aussi se terminer par la guérison; l'issue fatale dépend de la dose, le mode d'introduction de l'indol ne jouant ici aucun rôle.

2° Contrairement à l'opinion courante sur la résistance particulière naturelle de l'aorte du cobaye, la portion ascendante de la crosse de l'aorte dans la région des valvules subit souvent, spontanément, une sclérose spécifique. Ce processus peut se manifester par la dégénérescence cartilagineuse sous des formes diverses, suivie, dans des cas très rares, de calcification.

3° On peut considérer ce processus comme une maladie de l'âge.

4° On trouve un processus semblable de dégénérescence cartilagineuse chez la souris blanche et chez le rat d'égout.

5° L'introduction de petites doses d'indol (0 gr. 04 tous les jours, par voie buccale) durant une période assez longue pro-

voque chez le cobaye une dégénérescence athéromateuse de la paroi de l'aorte dans la région des valvules.

6° On constate aussi, dans ce cas, des processus chroniques interstitiels dans des organes différents : la sclérose des reins (singe et cobaye), les phases primaires de la cirrhose du foie (singe, cobaye), la sclérose de la capsule surrénale (singe), les phases primaires de la sclérose de l'aorte et du cerveau.

En terminant ce travail, nous accomplissons un agréable devoir en adressant nos remerciements à M. Metchnikoff, pour le sujet de recherches qu'il a bien voulu nous proposer et pour l'intérêt qu'il nous a témoigné en suivant de près notre travail dans tous ses détails.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. Metchnikoff. — *Etudes sur la nature humaine*, 1903.
2. E. Metchnikoff. — *Essais optimistes*, 1907.
3. Baeyer. — Ueber die Reduction des Indigoblaus (*Berichte*, 1868, 1, 17).
4. Brieger. — Ueber die flüchtigen Bestandtheile der menschlichen Excremente (*Berichte*, 1877, 10, 1029).
5. Herter. — An Experimental Study of the toxic proprieties of indol. (*Medic. Journal*, 1898).
6. Lewis C. Bruce. — The Clinical Significance of indoxyl in the urine (*The Journal of ment. Science*, 1906, t. LII, p. 218).
7. Pardo (G.). — Ricerche sull' indossiluria nelle malatie di mente (*Rivist. spiriment. di Freniatr.*, vol. XXXIII, p. 275).
8. Omorokoff. — Sur l'origine de l'indicanurie dans les maladies mentales (*Revue de Psychiatrie et de Neurologie*, 1909) (russe).
9. Ch. Hervieux. — Sur la prétendue toxicité des corps du groupe de l'indol (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, p. 895, séance du 18 mai).
10. Baumann et Brieger. — Ueber die Indoxylschwefel-Saüre, das Indican des Harns (*Zeitschr. für physiol. Chem.*, 1879, p. 255, v. 3).
11. Nencki. — Zur Geschichte des Indols und der Fäulnisprozesse im thierischen Organismus (*Berichte*, 1876).
12. Rovighi. — *Arch. di farmacologia terapeutica*, 1996, IV, 3.
13. Kukula. — Untersuchungen über Autointoxicationen (*Arch. f. klinisch. Chirurg.*, 1901, 36).
14. Ch. Porcher et Hervieux. — Recherches expérimentales sur les chromogènes urinaires du groupe de l'indol (*Journ. de Physiologie et de Pathol. générale*, 1906, p. 841).
15. E. Metchnikoff. — Etudes sur la flore intestinale. Deuxième mémoire. Poisons intestinaux et scléroses (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1910, t. XXIV).
16. Ch. Hervieux. — Recherches biochimiques sur l'indol et l'acide glycuronique (*Thèse*, 1908, Lyon).
17. E. Wang. — Fütterungsversuche mit Indol (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1899, t. XXVII, p. 557-575).
18. R. Grosser. — Ueber das Verhalten von zugeführten Indol und Scatol im Organismus (*Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1905, t. XLIV, p. 320-324).

19. Weinberg. — *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1908, p. 561, séance du 5 décembre.
20. Studzinski. — Contribution à l'action du coli-bacille sur l'Organisme animal (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1911, p. 255, 24 février).
21. Wladytchko. — Sur l'influence de certains poisons intestinaux sur le système central nerveux (*Rousski Vratch*, 1911, 39; p. 1493-94) (russe).
B. Danilewsky. — Ueber die Wirkung des Indols auf das Froschherz (*Pflügers Arch. f. die gesamt. Physiologie*, 1908, p. 361-376).

LÉGENDE DES PLANCHES VI à XI

Les contours et les détails des coupes ont été dessinés à l'aide de l'appareil de Zeiss. Nous nous sommes servi du microscope de Leitz (Obj. 3 et 6. Ocul. 4).

Pl. VI. — Coupes transversales des parois de l'aorte dans la région des valvules. Cobayes normaux.

Fig. 1. — Foyer cartilagineux dans la région de l'insertion des attaches qui rattachent les valvules à la paroi de l'aorte.

La grandeur du foyer n'a pas d'influence sur l'épaisseur de la paroi de l'aorte.

Fig. 2. — Un foyer semblable dans la paroi de l'aorte entre les attaches des valvules (celles-ci ne figurent pas sur le dessin). La paroi de l'aorte est un peu plus épaisse du côté de l'adventice et de l'intima, cet épaississement est dû au diamètre transversal du foyer.

Fig. 3. — Un foyer semblable de forme arrondie a dilaté fortement la paroi de l'aorte et a poussé en avant sa partie intérieure. Le centre du foyer est occupé par des cellules cartilagineuses typiques; dans la périphérie, une couche considérable des cellules arrondies de forme de passage.

Fig. 4. — Anomalie : 4 valvules. Dans la cloison divisant la valvule moyenne en deux, on voit distinctement des foyers cartilagineux qui ont dilaté cette cloison.

Pl. VII. — Coupes transversales du rein de singe (8 mois en expérience).

Fig. 1. — Un grand foyer d'infiltration par de petites cellules. Sur le fond de cette infiltration, les coupes transversales des tubes urinifères apparaissent comme des îlots.

Fig. 2. — Trois quarts de la périphérie du glomérule sont occupés par l'infiltration.

Fig. 3. — Tout le glomérule est entouré par l'infiltration.

Pl. VIII. — Coupes transversales du rein du même singe, colorées d'après Van Gieson.

Fig. 1. — Les glomérules sont ratatinés et sont enveloppés par une couche considérable du tissu conjonctif; deux (*a* et *b*) sont presque complètement détruits.

Fig. 2. — Image nette de l'infiltration périvasculaire par de petites cellules *a*, glomérule détruit.

Pl. IX. — Coupe transversale de la capsule surrénale du même singe.

Fig. 1. — Forte prolifération du tissu conjonctif dans la substance corticale; cette prolifération a la forme d'un triangle irrégulier, dont la base

touche presque la substance médullaire et dont le sommet est dirigé vers la périphérie. Des bandes de tissu conjonctif découpent des groupes arrondis de cellules de la glande, le tissu conjonctif couvre peu à peu toutes les cellules. On voit des cellules à noyaux picnotiques. On voit aussi sept parties calcifiées, avec un centre plus clair et une périphérie fortement colorée.

Pl. X. — Coupes transversales des aortes dans la région des valvules des cobayes (intoxication chronique par de petites doses d'indol).

Fig. 1. — (Cobaye 15, 5 mois en expérience). Dans la tunique moyenne, un foyer de dégénérescence hyaline, dont les trois quarts sont calcifiés ; dans les parties libres, on voit des restes des cellules. Tout le foyer a la forme d'un ovale allongé fortement comprimé ; du côté gauche, on voit une partie d'une forme irrégulière, sans structure déterminée; de petites cellules y sont disséminées sans ordre.

Fig. 2. — (Cobaye 3, 6 mois en expérience). Un grand foyer de dégénérescence hyaline de la paroi de l'aorte; presque toute la moitié gauche est imprégnée de sels calcaires; la partie droite ayant la forme d'un croissant passe à travers toute la partie moyenne de l'aorte et se heurte presque à l'intima; on voit dans cette partie des restes des cellules.

Fig. 3. — (Cobaye 1, 7 mois en expérience). Deux foyers cartilagineux et plusieurs cellules cartilagineuses disséminées, un grand foyer calcaire de la forme d'un triangle irrégulier; on voit dans ce foyer des restes de cellules cartilagineuses.

Pl. XI. — (Cobaye 22, 6 mois en expérience). Coupe transversale de l'aorte à l'endroit où se trouve la valvule moyenne.

Figure. — Un grand foyer de dégénérescence hyaline, contenant des cellules cartilagineuses disséminées; dans le centre, dépôt calcaire de forme d'une sphère.

Fig. *a* et *e*. — Deux foyers de dégénérescence hyaline, ne contenant pas de traces d'une structure cartilagineuse.

d) Deux petits foyers semblables.

e) Un foyer de dégénérescence hyaline très grand, presque tout imprégné de sels calcaires.

TECHNIQUE RATIONNELLE
DE LA RÉACTION DE FIXATION

par M. WEINBERG.

On a publié un grand nombre de procédés de réaction de fixation depuis que Wassermann, Bruck et Neisser ont eu l'idée d'utiliser le phénomène de Bordet-Gengou pour l'examen du sérum syphilitique. Cependant, lorsqu'on étudie par ces procédés une même série de sérums, on obtient souvent des résultats discordants. Cela tient d'abord à ce que certains auteurs ont publié leur technique après l'avoir expérimentée sur un nombre trop restreint de sérums; et, surtout, la plupart d'entre eux n'ont guère tenu compte, dans l'interprétation des résultats obtenus, des propriétés hémolytiques du sérum à examiner.

Pendant ces quatre dernières années, nous avons examiné un grand nombre de sérums humains, soit pour y rechercher les anticorps hydatiques, soit pour y trouver quelques éléments pouvant aider au diagnostic clinique du cancer; dans tous ces cas, nous avons fait comparativement la réaction de Wassermann. Voulant nous rendre compte de la cause des résultats contradictoires qu'on obtient par les procédés usuels, nous avons étudié, depuis quelque temps déjà et d'une façon systématique, les propriétés hémolytiques et antihémolytiques de tous les sérums que nous avons utilisés. Cette étude nous permet de donner une technique et une interprétation des résultats obtenus dans l'espoir de mettre les travailleurs à l'abri d'erreurs grossières.

Nous avons ici exclusivement en vue les procédés qui utilisent les globules rouges de mouton. Disons en passant que nous avons obtenu de bons résultats avec le procédé de Noguchi, qui exige un sérum anti-humain et des globules rouges humains. Nous devons cependant modifier quelque peu les indications de doses à employer dans ce procédé, telles que

nous les avons données dans un travail fait en commun avec Bronfenbrenner (1).

Tableau I.

		Nos des tubes	SÉRUM humain dilué au 1/4.	LIQUIDE hydatique.	ALEXINE à 50 p. 100.	EAU physiologique.	GLOB. ROUGES humains à 10 p. 100. sensibilisés.
	Sérum suspect.	1	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		3	0,1	—	0,1	0,7	0,1
Témoins	Sérum hydatique certain.	4	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		5	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		6	0,1	—	0,1	0,7	0,1
	Sérum sain.	7	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
		8	0,1	0,2	0,1	0,5	0,1
		9	0,1	—	0,1	0,7	0,1
		10	—	0,2	0,1	0,6	0,1
		11	—	0,4	0,1	0,4	0,1
		12	—	—	0,1	0,8	0,1
		13	—	—	—	0,9	0,1

Nous avons remarqué depuis qu'il n'est pas toujours possible de se contenter de petites doses de sérum; dans deux cas d'échinococcose, nous avons été obligé de doubler et même de tripler la quantité de sérum indiquée dans ce tableau pour arriver à un résultat positif.

Procédé rapide.

Ceci dit, revenons aux techniques qui nous intéressent ici, c'est-à-dire à celles où l'on emploie les hématies de mouton.

La technique simplifiée (ou les procédés rapides) ont gagné beaucoup de partisans parce que, ne demandant ni alexine de cobaye, ni sérum hémolytique, ils sont à la portée de tout

(1) Weinberg et Bronfenbrenner, Application du procédé de Noguchi à l'étude des sérums hydatiques. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1910, II p. 249-251.

travailleur même peu outillé. Cependant, la pratique de ces procédés d'après les indications fournies par leurs auteurs a donné des mécomptes. Dès nos premières recherches nous avons été à même de constater que les erreurs dues à ce procédé tiennent à la grande variabilité de la teneur du sérum humain en substances hémolytiques. Nous les avons signalées au mois de juin 1910 dans des conférences que M. Martin avait organisées à l'Institut Pasteur pour les internes des hôpitaux (1). L'importance qu'il y a à déterminer la richesse, en substances hémolytiques, du sérum frais, a été, en dehors de nous, reconnue par MM. Hallion et Bauer (2), et par M. Busilla (3).

Pour comprendre les erreurs auxquelles peut donner lieu la pratique de la réaction de fixation par le procédé rapide, on n'a qu'à jeter un coup d'œil sur le tableau II qui résume une partie de nos recherches sur les propriétés hémolytiques du sérum.

Ainsi, sur les 400 sérums étudiés, 9 ont donné l'index hémolytique 0, c'est-à-dire qu'à la dose de 0,1 cent. cube, ils ne dissolvaient pas 0,1 cent. cube de globules rouges de mouton. On obtenait cependant, pour quelques-uns de ces sérums, l'hémolyse en doublant la dose. D'autres étaient franchement anti-alexiques. Dans un quart des cas (exactement, 23 p. 100), l'index n'a pas dépassé 3; dans la moitié des cas, il était de 4 à 7; dans 10 p. 100 des cas, il était de 10-11; enfin, plus

(1) D'ailleurs, déjà en 1909 nous avons constaté qu'il est très important d'étudier le pouvoir hémolytique du sérum frais lorsqu'on veut pratiquer la réaction de fixation par le procédé rapide. C'est ainsi qu'en analysant un travail de M. Parvu, nous avons dit de la méthode simplifiée qu'il préconise pour le séro-diagnostic de l'échinococcose : qu' « elle peut donner de bons résultats à la condition qu'on prenne des précautions, qu'on ne doit jamais oublier, lorsqu'on se sert de procédés rapides : vérification du pouvoir hémolytique des sérums à étudier et contrôle par le procédé lent (avec les globules rouges sensibilisés et l'alexine de cobaye) lorsque le procédé rapide a donné un résultat nettement négatif ». (*Bull. de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 774.)

Au moment où parut la note de MM. Hallion et Bauer, nous avions déjà une grande expérience du procédé rapide pratiqué avec la correction sur laquelle ces auteurs ont insisté. C'est ce qui nous a permis d'ailleurs d'indiquer des erreurs que l'on commettrait si l'on suivait certains détails de leur technique (*Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1911, p. 108). On trouvera également des indications précises du procédé rapide, tel que nous l'employons depuis deux ans, dans le *Paris Médical* (5 août 1911, p. 232).

(2) Hallion et Bauer, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXIX, 29 octobre 1910, p. 305.

(3) Busilla, *Revista Stiintelor Medicale*, n° 10, octobre 1910, p. 838.

rarement, il a dépassé ce chiffre pour atteindre exceptionnellement le chiffre considérable de 21 et même de 23.

Il est évident que le sérum très pauvre en alexine peut donner lieu à la fixation non spécifique et fausser ainsi le résultat de l'expérience. Remarquons à ce propos qu'un index hémolytique élevé, comme celui de 10, par exemple, peut coïncider, rarement il est vrai, avec une quantité faible d'alexine. Dans ces cas, comme nous l'ont prouvé nos recherches, l'index élevé est dû à une grande richesse du sérum en ambocepteurs.

Enfin, un sérum très riche en alexine et ne refermant qu'une petite quantité d'anticorps spécifiques, peut ne perdre, par addition d'antigène, qu'une partie de son alexine. Il en restera donc suffisamment pour déterminer l'hémolyse de globules rouges ajoutés et donner ainsi lieu à une erreur d'interprétation.

TABLEAU II.

Propriétés hétérolytiques du sérum humain frais.

NOMBRE de sérums.	QUANTITÉS employées.	QUANTITÉ de globules de mouton à 5 p. 100 dissoute.	INDEX hémolytique du sérum frais.
9	0 c.c. 1	0 c.c. 0	0
20	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1
42	0 c.c. 1	0 c.c. 2	2
20	0 c.c. 1	0 c.c. 3	3
43	0 c.c. 1	0 c.c. 4	4
69	0 c.c. 1	0 c.c. 5	5
58	0 c.c. 1	0 c.c. 6	6
51	0 c.c. 1	0 c.c. 7	7
17	0 c.c. 1	0 c.c. 8	8
13	0 c.c. 1	0 c.c. 9	9
32	0 c.c. 1	1 c.c. 0	10
9	0 c.c. 1	1 c.c. 1	11
1	0 c.c. 1	1 c.c. 2	12
2	0 c.c. 1	1 c.c. 3	13
3	0 c.c. 1	1 c.c. 4	14
6	0 c.c. 1	1 c.c. 5	15
3	0 c.c. 1	1 c.c. 6	16
1	0 c.c. 1	2 c.c. 1	21
1	0 c.c. 1	2 c.c. 3	23
400			

Lorsque nous pratiquons le procédé rapide, nous faisons d'emblée notre expérience en double, c'est-à-dire que nous répétons deux fois la première série de deux tubes qui renferment le mélange de sérum-antigène-eau physiologique ; nous déterminons en même temps l'index hémolytique du sérum à examiner dans une série de tubes placés en arrière de la première série, comme l'indique le tableau III. Dans ces tubes, à 0,1 cent. cube de sérum, on ajoute des doses régulièrement croissantes de globules de mouton. Cela est suffisant, car dans plus de 90 p. 100 des cas l'index hémolytique ne dépasse guère 10 (1).

TABLEAU III.

Procédé rapide.

RÉACTION DE FIXATION							RECHERCHE DE L'INDEX HÉMOLYTIQUE				
Nos des tubes.	Sérum frais.	Liquide hydatique ou antigène syphilitique.	Eau physiologique.	Une heure d'étuve à 37 degrés.	Globules rouges de mouton à 5 p. 100.	Une demi-heure d'étuve à 37 degrés.	Nos des tubes.	Sérum frais.	Globules rouges de mouton à 5 p. 100	Eau physiologique.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
1	0,1	0,1	0,2		0,1		1	0,1	0,1	1 c. c.	
2	0,1	0,2	0,1		0,1		2	0,1	0,2	0,9	
3	0,1	—	0,3		0,1		3	0,1	0,3	0,8	
»	»	»	»		»		4	0,1	0,4	0,7	
»	»	»	»		»		5	0,1	0,5	0,6	
»	»	»	»		»		6	0,1	0,6	0,5	
4	0,1	0,1	0,2		0,2		7	0,1	0,7	0,4	
5	0,1	0,2	0,1		0,2		8	0,1	0,8	0,3	
6	0,1	—	0,3		0,2		9	0,1	0,9	0,2	
»	»	»	»		»		10	0,1	1 c.c.	0,1	

Lorsqu'on a quelques raisons de croire (tuberculose, cancer, suppuration, etc...) qu'on est en présence d'un sérum forte-

(1) La question de l'antigène ne nous préoccupe pas ici. Il est bien entendu que dans le cas de syphilis nous employons, comme maximum, le tiers de la dose la plus forte d'antigène, incapable par elle-même d'empêcher l'hémolyse. Nous avons toujours obtenu les meilleurs résultats dans les cas d'échinococcose avec le liquide hydatique de foie de mouton.

ment hémolytique, on peut employer des doses doubles d'hématies, en allant de 0,2 à 2 cent. cubes. D'ailleurs, si, en procédant d'après les indications ordinaires, on obtient une hémolyse complète dans le dernier tube, ce qui indiquerait que l'index 10 peut être dépassé, la durée de l'expérience n'en est nullement prolongée. En effet, si élevé que soit cet index, on doit continuer l'expérience de la même façon : ajouter dans chaque tube de la première série (tubes 1, 2, 3) 0,1 cent. cube de globules rouges et 0,2 cent. cube dans chaque tube de la deuxième (tubes 4, 5, 6). On a tout le temps, pendant la 1/2 heure de séjour de ces tubes à l'étuve à 37 degrés, de compléter la détermination de l'index hémolytique en préparant de nouveaux mélanges de 0,1 cent. cube avec des doses plus considérables de globules rouges.

Nous avons dit que nous ajoutions toujours, dans chaque série de tubes composant une expérience de fixation, la dose constante de globules rouges (0,1 cent. cube pour la première et 0,2 cent. cube pour la deuxième série); et en cela aussi notre pratique diffère de celle conseillée par Hallion et Bauer, d'une part, et par Busilla, d'autre part. Ces savants déterminent la dilution maxima de globules rouges dissous par 0,1 cent. cube de sérum frais et emploient pour leur réaction une émulsion beaucoup plus faible.

Cette pratique est défectueuse car la dose employée par ces auteurs est, dans beaucoup de cas, supérieure à celle qui donne le meilleur résultat. D'autre part, il est très dangereux d'employer une dilution de globules rouges inférieure à 1/20, ce que ces auteurs sont nécessairement amenés à faire lorsque l'index hémolytique est de 1.

Interprétation. — Il arrive exceptionnellement que le sérum frais soit anti-alexique; dans ces conditions, la pratique du procédé rapide est impossible. Si l'index hémolytique est 0, on peut, le plus souvent, comme cela a été déjà indiqué par d'autres auteurs, obtenir l'hémolyse en doublant la dose de sérum.

Nous avons vu plus haut que dans nos observations, l'index hémolytique était 91 fois sur 400 de 0 à 3; cela veut dire que, dans 22,75 p. 100 de cas, le résultat obtenu ne pouvait être considéré comme définitif que lorsqu'il était nettement négatif.

On peut parfois obtenir une réaction négative, même en employant 0,2 cent. cube de globules rouges avec du sérum dont l'index est de 2 ou 3, surtout en utilisant un antigène très pauvre en substances anticomplémentaires.

Lorsque l'index hémolytique dépasse la moyenne (8-10), il ne faut tenir compte du résultat que s'il est obtenu avec 0,1 cent. cube de globules rouges. Encore faut-il se rappeler qu'on trouve des sérums, nous en avons parlé déjà plus haut, qui peuvent donner un index hémolytique élevé tout en étant pauvres en alexine. Ces cas sont heureusement très rares.

Lorsque l'index dépasse 10, le résultat positif obtenu avec 0,1 cent. cube d'hématies doit être, en général, considéré comme certain et définitif.

En somme, pour nous, la pratique de l'expérience en double et la détermination de l'index hémolytique servent uniquement à juger avec certitude le résultat obtenu avec 0,1 cent. cube de globules rouges.

Ceux fournis par 0,2 de globules rouges ne seront utiles qu'autant qu'ils confirmeront le résultat négatif obtenu avec la première dose d'hématies.

On ne doit se contenter du procédé rapide que lorsqu'on obtient un résultat nettement négatif avec les sérums dont l'index ne dépasse pas 3, *et un résultat nettement positif lorsqu'on a une fixation très nette avec un sérum dont l'index dépasse* 10, *la dose de globules rouges restant de* 0,1.

Si les résultats donnés par les deux expériences du procédé rapide sont contradictoires, on doit les considérer comme douteux, et recourir au procédé lent.

Procédé lent.

Pour que la réaction soit pratiquée dans de bonnes conditions par le procédé lent, il est indispensable que tous les tubes de l'expérience renferment la même quantité d'ambocepteurs hémolytiques et d'alexine. Or, ces conditions sont rarement réalisées; cela provient de la teneur variable du sérum humain en ambocepteurs anti-mouton, dont l'action s'ajoute à celle du sérum hémolytique artificiel et trouble ainsi la régularité de l'expérience.

La lecture du tableau IV permet de se rendre compte des différences quantitatives considérables que présentent les sérums chauffés, quant à leur propriété de sensibiliser les globules de mouton. On y voit que, dans 121 cas sur 254 (dans 47 p. 100 des cas environ), l'index ne dépasse pas 3 ; que, dans un quart de cas (62 sur 254), il atteint ou dépasse 10 ; enfin, il peut atteindre les chiffres 20 et 25, c'est-à-dire que exceptionnellement 0,1 cent. cube de sérum serait capable de sensibiliser 2 cent. cubes et même 2,5 cent. cubes de globules rouges de mouton.

Tableau IV.

Propriétés hétérolytiques du sérum humain chauffé une demi heure à 56 degrés.

NOMBRE de sérums examinés.	QUANTITÉ de sérum employée.	ALEXINE de cobaye à 50 p. 100.	QUANTITÉ de globules de mouton à 5 p. 100 dissoute.	INDICE apparent d'ambocepteurs hétérolytiques.
13	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 0	0
37	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1
31	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 2	2
40	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 3	3
20	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 4	4
12	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 5	5
20	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 6	6
11	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 7	7
3	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 8	8
5	0 c.c. 1	0 c.c. 1	0 c.c. 9	9
25	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 0	10
3	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 1	11
6	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 2	12
7	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 3	13
4	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 4	14
7	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 5	15
3	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 6	16
1	0 c.c. 1	0 c.c. 1	1 c.c. 7	17
3	0 c.c. 1	0 c.c. 1	2 c.c. 0	20
1	0 c.c. 1	0 c.c. 1	2 c.c. 3	23
1	0 c.c. 1	0 c.c. 1	2 c.c. 4	24
1	0 c.c. 1	0 c.c. 1	2 c.c. 5	25
254				

La richesse parfois considérable du sérum humain chauffé en

ambocepteurs hémolytiques avait inspiré à Bauer un procédé dans lequel on se passe de sérum hémolytique artificiel. Cette manière de faire, appliquée uniformément à tous les sérums, est aussi défectueuse que la pratique dans laquelle on ne tient pas du tout compte de l'index de la sensibilisatrice.

Notre expérience nous a, en effet, montré que la réaction de fixation faite avec des globules rouges non sensibilisés, ne peut donner de résultats convenables que lorsque l'index des sensibilisatrices du sérum chauffé atteint ou dépasse 10.

Or, cet index élevé n'est obtenu, comme nous l'avons vu plus haut, qu'avec 25 p. 100 des sérums.

De plus, il faut noter qu'on trouve quelquefois des sérums à index 10, lesquels, examinés par le procédé de Bauer, donnent une légère fixation non spécifique. L'explication de ce fait doit être cherchée dans l'action des substances anti-alexiques contenues en quantités plus ou moins considérables dans le sérum chauffé, et dont l'existence nous a déjà permis de constater la grande différence qui existe parfois entre l'*index apparent* et l'*index vrai* d'ambocepteurs d'un même sérum chauffé (1).

Dans le procédé lent, on emploie les doses de 0,3 cent. cube de sérum chauffé; or, l'action des doses croissantes du sérum chauffé est très inégale. Ainsi les 0,3 cent. cube d'un sérum à index 10 peuvent, en présence d'une même alexine, provoquer l'hémolyse d'une quantité de globules notablement inférieure à 3 cent. cubes, comme le montre le tableau ci-dessous.

Il faudra donc tenir compte de cet affaiblissement du pouvoir hémolytique des doses croissantes lorsqu'on voudra déterminer la quantité de sérum hémolytique à ajouter dans chaque tube de l'expérience renfermant du sérum chauffé.

Le tableau VI indique les doses que nous employons dans le procédé lent, que la réaction soit faite avec le sérum syphilitique ou échinococcique.

Comme on le voit, nous répétons la première partie de l'expérience en double.

Nous admettons que, pour la bonne conduite de la réaction de fixation, il faut employer 30 unités hémolytiques; c'est-à-dire qu'il faut sensibiliser chaque centimètre cube de globules

(1) Voir notre communication à la Société de Biologie, séance du 18 novembre 1911, t. LXXI, p. 453.

rouges avec 0,1 cent. cube d'une dilution de sérum lapin-mouton capable par lui-même de sensibiliser 3 cent. cubes d'hématies.

TABLEAU V.

NOMBRE de sérums ayant le même pouvoir sensibilisant.	INDEX d'ambocepteurs anti-mouton.	QUANTITÉ DE GLOB. ROUGES (à 5 p. 100) dissous par la même quantité d'alexine après sensibilisation par 0,3 c. c. de sérum.
11	1	0,3 c.c. pour 10 sérums. 0,2 c.c. — 1 —
9	2	0,8 c.c. pour 1 sérum. 0,6 c.c. — 3 — 0.5 c.c. — 5 —
10	3	0,8 c.c. pour 4 sérums. 0,7 c.c. — 4 — 0.5 c.c. — 2 —
2	4	1,1 c.c. pour 1 sérum. 0,8 c.c. — 1 —
3	5	1,3 c.c. pour 1 sérum. 1,2 c.c. — 2 sérums.
4	6	1,5 c.c. pour 3 sérums. 1,4 c.c. — 1 sérum.
2	7	1,8 c.c. pour 2 sérums.
1	9	2,5 c.c. pour 1 sérum.
2	10	2,5 c.c. pour 1 sérum. 2,0 c.c. — 1 —
1	11	2,5 c.c. pour 1 sérum.
3	12	3,0 c c. pour 1 sérum. 2,5 c c. — 2 sérums.
1	13	3,0 c.c. pour 1 sérum.
2	14	4,0 c.c. pour 1 sérum. 3,5 c.c. — 1 —
2	15	3,0 c.c. pour 1 sérum. 3,5 c.c. — 1 —
53		53 sérums.

La première série de tubes recevra comme sérum hémoly-

tique non pas 30 unités, mais 30 unités moins le nombre qui sera indiqué par l'index d'ambocepteurs déterminé pour chaque sérum à examiner, d'après les indications données dans la partie droite du tableau VI.

Prenons un exemple concret. Supposons que nous ayons obtenu le chiffre 6 comme titre de la sensibilisatrice hémolytique anti-mouton du sérum chauffé A. Cela veut dire qu'un dixième de ce sérum est capable de sensibiliser 0,6 cent. cube de globules rouges. Ce sérum renferme donc, à la dose de 0,1 cent. cube, 6 unités d'ambocepteurs. Comme nous employons dans notre expérience de fixation 0,3 cent. cube de chaque sérum à examiner, il s'ensuit que les 4 premiers tubes renfermeront déjà, de par la présence du sérum, 18 unités hémolytiques, tandis qu'il n'y en aura pas du tout dans les tubes témoins. Comme d'autre part chaque tube de l'expérience doit recevoir 30 unités, il faudra donc n'ajouter dans les 4 premiers tubes que 12 unités seulement. En réalité, pour corriger l'action anti-alexique des doses croissantes de sérum chauffé, il faut faire le calcul en se basant sur le chiffre d'une unité inférieure à celui indiqué par l'index.

Ainsi dans notre exemple l'index étant de 6, nous ferons notre calcul d'après l'index 5. Nous agirons donc comme si les 0,3 cent. cube de sérum renfermaient 15 et non 18 unités d'ambocepteur.

Il est évident qu'on ne versera pas du tout de sérum hémolytique dans les 4 premiers tubes de l'expérience lorsque le titre de la sensibilisation atteint ou dépasse 10.

Pour bien pratiquer la réaction de fixation, il faut titrer avec soin le sérum hémolytique lapin-mouton et établir exactement la dilution dont 0,1 cent. cube sensibilise 1 cent. cube de globules rouges, c'est-à-dire correspondant à 10 unités hémolytiques. On prépare rapidement une dilution extemporanée, supplémentaire, suivant la quantité d'ambocepteurs à ajouter dans les premiers tubes.

Dans la pratique courante, comme un léger excès de sensibilisatrice n'influe pas défavorablement sur le résultat de la réaction, nous procédons de la façon suivante : Nous ne tenons pas compte de l'index tant qu'il ne dépasse pas 3; dans ce cas, il est inutile de faire l'expérience en double, tous les tubes reçoi-

Tableau VI.

Procédé lent.

RÉACTION DE FIXATION (KYSTE HYDATIQUE)

Nos des tubes.	Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.	Liquide hydatique.	Alexine diluée de moitié.	Eau physiologique.	Une heure d'étuve à 37 degrés.	Globules rouges insensibilisés.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
Série A. 1	0,3	0,2	0,1	1,4	Une heure d'étuve à 37 degrés.	1 c. c.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
2	0,3	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	
3	0,3	0,4	0,1	1,2		1 c. c.	
4	0,3	—	0,1	1,6		1 c. c.	
Série B. 5	0,3	0,2	0,1	1,4		1 c. c.	
6	0,3	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	
7	0,3	0,4	0,1	1,2		1 c. c.	
8	0,3	—	0,1	1,6		1 c. c.	
9	—	0,4	0,1	1,5		1 c. c.	
10	—	0,6	0,1	1,3		1 c. c.	
11	—	0,8	0,1	1,1		1 c. c.	
12	—	—	0,1	1,9		1 c. c.	
13	—	—	—	2cc		1 c. c.	

RÉACTION DE FIXATION (SYPHYLIS)

Nos des tubes.	Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.	Antigène syphilitique.	Alexine diluée de moitié.	Eau physiologique.	Une heure d'étuve à 37 degrés.	Globules rouges (sensibilisés).	Une heure d'étuve à 37 degrés.
1	0,3	0,1	0,1	1,5	Une heure d'étuve à 37 degrés.	1 c. c.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
2	0,3	0,2	0,1	1,4		1 c. c.	
3	0,3	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	
4	0,3	—	0,1	1,6		1 c. c.	
5	0,3	0,1	0,1	1,5		1 c. c.	
6	0,3	0,2	0,1	1,4		1 c. c.	
7	0.3	0,3	0,1	1,3		1 c. c.	
8	0.3	—	0,1	1,6		1 c. c.	
9	—	0,2	0,1	1,7		1 c. c.	
10	—	0,4	0,1	1,5		1 c. c.	
11	—	0,6	0,1	1,3		1 c. c.	
12	—	—	0,1	1,9		1 c. c.	
13	—	—	—	2cc		1 c. c.	

TITRAGE DE LA SENSIBILISATION DU SÉRUM CHAUFFÉ

Nos des tubes.	Sérum chauffé à 56 degrés 1/2 heure.	Globules rouges de mouton à 5 p. 100.	Alexine à 1/2.	Eau physiologique.	Une heure d'étuve à 37 degrés.
1	0,1	0,1	0,1	1cc	Une heure d'étuve à 37 degrés.
2	0,1	0,2	0,1	0,9	
3	0,1	0,3	0,1	0,8	
4	0,1	0,4	0,1	0,7	
5	0,1	0,5	0,1	0,6	
6	0,1	0,6	0,1	0,5	
7	0,1	0,7	0,1	0,4	
8	0.1	0,8	0,1	0,3	
9	0.1	0,9	0,1	0,2	
10	0,1	1cc	0,1	0,1	
»	»	»	»	»	
»	»	»	»	»	
»	»	»	»	»	

vent la même quantité d'ambocepteurs hémolytiques. Lorsque l'index est de 4 à 6, sensibiliser chaque centimètre cube de globules rouges destinés aux 4 premiers tubes de l'expérience avec 20 unités hémolytiques. Si l'index est de 7, 8, 9, employer 15 unités.

On simplifie l'opération en préparant 3 dilutions de sérum hémolytique dont 0,1 cent. cube représente 30, 15 ou 10 unités d'ambocepteurs.

Les globules rouges sont utilisés sans sensibilisation préalable, si l'index atteint ou dépasse 10.

Cette manière de faire ne prolonge la durée de l'expérience que de quelques minutes; ce petit inconvénient s'efface devant l'avantage d'assurer une précision beaucoup plus grande.

Avant d'aborder l'interprétation des résultats obtenus, il nous paraît nécessaire d'insister sur un autre détail de technique. On emploie dans cette expérience le sérum de cobaye. Or, la teneur du sérum de cobaye en alexine est très variable, comme cela était déjà observé par Massol et Grysez ainsi que par Noguchi. Le sérum de cobaye renferme non seulement de l'alexine, mais aussi des ambocepteurs anti-mouton; ces derniers peuvent, exceptionnellement, s'y trouver en quantité assez considérable.

TABLEAU VII.

Propriétés hétérolytiques du sérum de cobaye frais.

NOMBRE de sérums examinés.	QUANTITÉ de sérum à 50 p. 100 employée.	QUANTITÉ de globules de moutons à 5 p. 100 dissoute.
19	0 c.c. 3	0 c.c. 0
25	0 c.c. 3	0 c.c. 1
49	0 c.c. 2	0 c.c. 1
33	0 c.c. 1	0 c.c. 1
5	0 c.c. 1	0 c.c. 2
8	0 c.c. 1	0 c.c. 3
1	0 c.c. 1	1 c.c. 2
140		

L'étude de 140 sérums de cobayes résumée dans ce petit

tableau montre que si dans la moitié des cas il faut 0,2 à 0.3 cent. cube de sérum pour dissoudre 0,1 d'hématie de mouton, dans 10 p. 100 des cas 0,1 cent. cube d'alexine dissout 0,2 et 0,3 cent. cube des mêmes globules. Dans un cas, nous avons même obtenu l'hémolyse de 1,2 cent. cube de globules avec la même dose (0,1) d'alexine. Il y a aussi un autre facteur sur lequel l'attention a été attirée par Noguchi et Bronfenbrenner.

Ces auteurs ont remarqué que la propriété de l'alexine d'être fixée par la combinaison antigène-anticorps est très variable suivant les cobayes. Leur étude a cependant montré que, dans la moitié des cas, le sérum de cobaye possède une fixabilité moyenne.

Il est donc bon pour obvier à tous les inconvénients présentés par la teneur variable du sérum de cobaye en alexine, ambocepteurs anti-mouton et également par la propriété variable de se laisser fixer par l'antigène-anticorps, d'employer un mélange de sérum de 3 cobayes. En tout cas, il est nécessaire de vérifier les propriétés du sérum de cobaye, lorsque pour des raisons quelconques on ne disposera que du sérum d'un seul animal.

Nous avons également employé un autre procédé lent dans lequel le sérum humain est débarrassé après le chauffage à 56 degrés de tous les ambocepteurs hémolytiques par contact d'une demi-heure à l'étuve à 37 degrés avec un excès de globules rouges de mouton. Ce procédé avait déjà été employé par Apphatil et Lorentz, par nous-même ainsi que par Müntz et par Rossi. Dans la grande majorité des cas cette technique donne de bons résultats. Cependant, nous ne conseillons pas de l'employer, car, dans 2 cas, sur 50 sérums, nous avons obtenu des résultats peu satisfaisants.

Interprétation des résultats obtenus par le procédé lent.

Appelons série A la première rangée de tubes où le sérum hémolytique lapin-mouton n'a été ajouté qu'en quantité suffisante pour compléter les ambocepteurs naturels, et série B la deuxième série de 4 tubes pour lesquels les globules rouges ont été sensibilisés de la même façon que pour les tubes témoins.

Remarquons d'abord que la série B ne peut pas donner de résultat positif si la réaction est négative dans les tubes de la série A.

Le résultat négatif de A donne une certitude au résultat négatif de la série B; d'autre part, le résultat positif donné par la série A est corroboré par la réaction positive donnée par la série B, dans laquelle les globules sont sensibilisés, le plus souvent, avec un excès d'ambocepteurs.

Lorsque une réaction légèrement positive de la série A n'est pas confirmée par la série B, il faut considérer le cas comme douteux.

Discussion des résultats obtenus par les deux procédés pour le même sérum.

Il y a des sérums pour lesquels la réaction ne peut être pratiquée d'une façon convenable; il arrive, en effet, exceptionnellement, que le sérum renferme soit à l'état frais, soit après chauffage à 56 degrés, une quantité considérable de substances anti-complémentaires. L'index anti-alexique d'un des sérums que nous avons étudié était de 8; c'est-à-dire que 0,8 cent. cube d'alexine à 50 p. 100 étaient nécessaires pour neutraliser l'action anti-hémolytique de 0,1 cent. cube de ce sérum.

Nous présentons ici un petit tableau qui résume les résultats qu'on peut obtenir en examinant un même sérum simultanément par les procédés rapide et lent.

On voit d'après ce résumé, qu'en somme on ne pourrait se dispenser du procédé lent que lorsque le procédé rapide donne une réaction nettement négative avec un index très faible ou bien en présence d'un résultat franchement positif donné par un sérum dont l'index atteint ou surtout dépasse 10. Or, d'après notre statistique de l'index hémolytique du sérum frais (tableau II), le nombre de ces cas est limité, surtout si l'on considère que beaucoup de ces sérums donnent justement des résultats contraires à ceux que nous venons d'indiquer.

Il faudra donc, pour la plupart des cas, répéter l'expérience par le procédé lent. Personnellement, nous recommandons vivement de faire des recherches parallèles par les deux réactions pour se mettre à l'abri de toute erreur. Il y a, en effet, des

sérums frais à index élevé, mais pauvres en alexine; dans ce cas, la réaction positive à cause du manque d'alexine, sera corrigée par le procédé lent.

	RÉACTION OBTENUE par le procédé rapide.		RÉACTION OBTENUE par le procédé lent.	RÉSULTAT doit-être considéré comme :
I	+	Index hémol. faible.	+	+
I a			0	0
II	+	Index moyen ou élevé.	+	+
II a			0	Douteux.
III	0	Index faible.	0	0
III a			+	Douteux.
IV	0	Index moyen.	0	0
IV a			+	+
V	0	Index élevé.	0	0
V a			+	Douteux.

Maintenant nous allons examiner l'un après l'autre les cas qui peuvent se présenter, en laissant de côté, bien entendu, les résultats concordants par les deux procédés.

Le cas I *a* doit être considéré comme négatif; il est évident que la réaction positive obtenue par le procédé rapide indique une fixation non spécifique due au manque d'alexine.

Le cas II *a* doit être considéré comme douteux. Il peut arriver, en effet, que le chauffage à 56 degrés ait détruit une trop grande quantité d'anticorps spécifiques pour permettre le phénomène de fixation du complément. La diminution d'ambocepteurs naturels ou d'immunisation est un fait connu. D'après notre statistique, la perte en ambocepteurs par le chauffage à 56 degrés peut atteindre jusqu'à 80 p. 100. On comprend alors que le chauffage puisse dans certains cas influencer défavorablement la réaction de fixation, surtout lorsque les anticorps ne sont pas en grande quantité.

Nous avons déjà expliqué la raison du cas II *a*; on trouve des sérums frais dont l'index hémolytique élevé (8-10) est surtout dû à l'excès d'ambocepteurs anti-mouton; le procédé lent corrige facilement l'erreur du procédé rapide. Ces cas sont rares.

Nous n'avons jamais rencontré de sérum rentrant dans la catégorie III *a*; la raison en est facile à comprendre.

Les cas rentrant dans la catégorie IV *a*, doivent aussi être expliqués par la pauvreté relative du sérum frais en alexine.

On comprend aisément que dans le cas V *a*, la fixation du complément par le procédé rapide soit masquée par l'excès d'alexine. Lorsqu'une réaction légère obtenue par le procédé rapide n'est pas corrigée par un résultat très net du procédé lent, on se trouve en présence d'un cas douteux.

Ces réactions légères ou douteuses peuvent être dues soit à la présence d'une quantité insuffisante d'anticorps, soit à des substances non spécifiques se trouvant momentanément dans le courant circulatoire et qui sont dues probablement (ou bien) au régime alimentaire ou bien à l'élaboration de produits pathologiques au niveau des organes atteints.

Quelle que soit la minutie apportée dans la pratique de la séro-réaction, il est impossible d'éviter complètement les réactions légères, douteuses. On peut cependant arriver à leur juste interprétation en étudiant de près les propriétés anti-hémolytiques du sérum à examiner.

Les résultats douteux ne peuvent nullement servir au diagnostic clinique de la syphilis ou de l'échinococcose. Mais ils permettent de suivre la réaction de l'organisme chez les malades avec le sérum desquels on a obtenu avant le traitement de la syphilis ou bien avant l'opération de kyste hydatique une fixation du complément très nette, négative ou positive.

Nous sommes convaincus que le pourcentage des réactions positives obtenues chez les malades syphilitiques est bien supérieur à la réalité, justement à cause des réactions légères, non spécifiques, mais considérées comme positives pour la seule raison qu'elles concernaient des malades reconnus ensuite syphilitiques par l'éclosion de symptômes décisifs; et cela d'autant plus que le nombre de ces réactions douteuses augmente considérablement lorsqu'on pratique la réaction de fixation sans tenir compte des propriétés hémolytiques du sérum.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE SUBSTANCES ALBUMINOÏDES EXTRAITES DU CERVEAU

par A. MARIE.

Dans l'étude expérimentale des toxi-infections locales, comme la diphtérie, le tétanos, la rage, la fixation de l'antigène sur certaines substances chimiques de l'organisme s'offre à nous comme une recherche des plus intéressantes, puisqu'elle nous fait pénétrer dans l'intimité des phénomènes et qu'elle touche à la question des réactions d'immunité.

Mais, tandis qu'on n'a jamais réussi à préparer le composé de nature albuminoïdique (1) auquel la matière nerveuse doit ses propriétés antitétaniques, nous avons pu isoler du cerveau une substance offrant les réactions générales des albuminoïdes et qui présente le pouvoir de neutraliser le virus de la rage. Dans ce travail, après avoir exposé les propriétés antirabiques des extraits de la matière cérébrale, nous montrerons qu'ils sont doués également d'une certaine toxicité pour l'organisme.

I. — Propriétés antirabiques.

Certains faits déjà anciens, en particulier l'action protectrice des filtrats de substance cérébrale contre une infection rabique, nous avaient conduit à supposer dans le cerveau l'existence d'un pouvoir neutralisant. Si l'on injecte dans le sang, à des lapins, une quantité convenable du filtrat de cet organe, on peut les voir résister à une infection rabique pratiquée par la voie oculaire (2). Remlinger avait même observé que le virus filtré, injecté à dose massive sous la peau, pouvait conférer aux animaux une immunité leur permettant de résister à l'inoculation virulente sous-méningée (3). Toutefois, en dépit de nombreux essais pratiqués *in vitro*, nous n'avions jamais réussi à démontrer,

dans les filtrats cérébraux, l'existence d'un principe neutralisant du virus.

Ayant eu alors à notre disposition l'encéphale d'une personne morte de rage, nous avions soumis à l'action du vide sulfurique le liquide obtenu en comprimant le cerveau broyé avec du sable à plusieurs centaines d'atmosphères. En reprenant par l'eau distillée le suc desséché et pesé, on peut préparer une solution isotonique et la stériliser au moyen d'un filtre Chamberland. Elle présente une propriété remarquable : additionnée de son volume d'une émulsion centésimale de virus fixe, elle la neutralise en quelques heures, car le mélange injecté dans le cerveau d'un animal se montre absolument inoffensif pour lui.

Ce pouvoir neutralisant ne se manifeste pas seulement avec l'extrait de cerveau rabique; on peut l'observer en utilisant l'encéphale d'individus ayant succombé aux maladies les plus diverses, en particulier à des affections nerveuses telles que la paralysie générale, auquel cas les propriétés antirabiques se montrent plus énergiques.

Le principe auquel les extraits cérébraux sont redevables de leur action neutralisante se trouve entraîné par des précipités offrant les caractères généraux des nucléoprotéides, comme le prouve le mode de préparation suivant.

On traite par une solution sodique faible (1 p. 100) un fragment de cerveau humain et on filtre l'émulsion sur bougie. Après addition d'HCl, le précipité obtenu est recueilli par centrifugation puis redissous dans un liquide convenable, du sérum sanguin par exemple. Il présente *in vitro* des propriétés antirabiques analogues à celles que nous avons reconnues au suc de presse, préparé comme nous l'avons dit (4).

Nous avons résumé en un tableau quelques-unes de ces expériences. (Tableau I.)

Il résulte de celles-ci que le cerveau, le seul organe qui assure la culture du virus rabique, renferme une substance douée d'une affinité élective, d'un pouvoir neutralisant pour lui, que cette substance, partiellement soluble à la faveur des produits complexes entrant dans la composition de cet organe, est entraînée par des précipités nucléoprotéiniques et se présente comme étant thermostabile. Nous allons montrer maintenant que cette substance est de nature albuminoïdique.

TABLEAU I

ACTION NEUTRALISANTE EXERCÉE PAR LE SUC DE PRESSE ET LA NUCLÉOPROTÉINE.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Suc du cerveau rabique humain + VF 1 p. 100 à PE.	∝
2. Lapin.	1 partie du même suc + 2 parties de VF 1 p. 100.	∝
3. Cobaye.	Suc du cerveau (enfant diphtérique) + VF 1 p. 100 à PE.	∝
4. Cobaye.	Suc cérébral (PGP) + VF 1 p. 100. Centrifugation et injection du dépôt.	∝
5. Cobaye.	1 partie du même suc cérébral + 4 parties de VF 1 p. 100	∝
6. Cobaye.	Suc chauffé 40 minutes à 55 degrés + VF 1 p. 100 à PE.	∝
7. Cobaye.	Nucléoprotéine cérébrale neutralisée + VF 1 p. 100 à PE	∝
8. Lapin.	La même chauffée à 56 degrés + VF 1 p. 100 à PE.	∝

Dans son travail classique sur les protéines du tissu nerveux (5), Halliburton admet que la matière albuminoïde s'y présente sous trois états, une neuroglobuline α, coagulable à 47 degrés, une neuroglobuline β, coagulable à 70 — 75 degrés, l'une et l'autre précipitables par les sels neutres et ne contenant pas de Ph, enfin un nucléoprotéide coagulable à 56 — 60 degrés, renfermant 0,50 p. 100 de Ph, et pour lequel il préconise le mode de préparation suivant. L'encéphale, débarrassé du sang et des méninges, est broyé et traité par une grande quantité d'H^2O pendant vingt-quatre heures, après quoi le liquide surnageant est décanté et précipité par l'acide acétique à 33 p. 100, à raison de 0,50 cent. cubes pour chaque centimètre cube de liquide ; le précipité est lavé à l'eau distillée. Il ne diffère guère de ceux que nous avions obtenus en traitant la matière nerveuse par des solutions alcalines faibles, car nous avons constaté que ce précipité entraîne également la substance antirabique puisque, additionné, après dialyse, de VF à 1 p. 100, il le neutralise semblablement.

Par contre, nous avons obtenu des résultats inconstants en utilisant le mode de préparation indiqué par Levene (6), consistant à épuiser la matière cérébrale par une solution de NH^4Cl à 4 p. 100 et à précipiter le filtrat par l'acide acétique.

Qu'il s'agisse de la technique de Halliburton ou de celle de Levene, le mode de préparation est assez laborieux, sa lenteur expose les albuminoïdes du cerveau à des altérations diverses ; il faut donc obtenir à l'état pur le produit jouissant par lui-même des propriétés antirabiques. A la suite de nombreux essais, nous nous sommes arrêté à la technique suivante (7) :

On prépare dans 100 cent. cubes d'eau distillée une émulsion de 10 grammes de cerveau finement broyé, à laquelle on ajoute X gouttes d'acide acétique cristallisable. Après agitation convenable, on centrifuge ou bien on jette sur un filtre le précipité qui est repris par environ 40 cent. cubes d'eau et traité de nouveau par l'acide acétique (1 cent. cube) ; on filtre le mélange pour obtenir le liquide clair qui contient le principe neutralisant ainsi que le nucléoprotéide du cerveau. On peut alors précipiter celui-ci par NaCl à 20 p. 100.

La solution active isolée de la sorte sera neutralisée et dialysée avec soin avant d'être mise en contact avec le virus rabique (pendant vingt-quatre heures).

Ses caractères chimiques sont ceux d'un acidalbuminoïde. Il ne contient pas de Ph, est précipité de ses solutions par la dialyse, par neutralisation ; la température de l'ébullition n'y détermine pas de coagulum, le sulfate de magnésie à saturation le précipite. En plus de ces réactions de précipitation, cette substance présente celles de coloration communes à tous les albuminoïdes (réactions de Millon, du biuret, xanthoprotéique).

Si l'on prépare un mélange de cet acidalbuminoïde et de virus fixe, on trouve que celui-ci ne tarde pas à perdre ses propriétés pathogènes.

La même émulsion virulente traitée par du sérum neuf additionné de quantités variables d'acétate de soude, ou encore par des solutions plus ou moins concentrées de ce sel, conserve tout son pouvoir pathogène. Un autre organe que l'encéphale, la rate par exemple, traitée de la même façon que lui, ne montre aucune propriété neutralisante. (Tableau II.)

Les propriétés neutralisantes que l'expérimentation révèle dans cet acidalbuminoïde font défaut dans les autres substances protéiques du cerveau. Ainsi le premier filtrat obtenu dans notre mode de préparation et qui renferme les neuroglobulines, le résidu laissé par la filtration de la liqueur contenant le nucléo-

protéide (1), celui-ci lui-même, n'exercent aucune action neutralisante sur le virus rabique.

TABLEAU II

Action neutralisante de l'acidalbuminoïde extrait du cerveau neuf.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Acidalbuminoïde de mouton + VF 1 p. 100 à PE.	∞
2. Cobaye.	Acidalbuminoïde de cerveau humain (PGP) + VF 1 p. 100	∞
3. Cobaye.	1 partie de cet albuminoïde + 5 parties de VF 1 p. 100	∞
4. Cobaye.	Le même, chauffé 30 minutes à 56 degrés + VF 1 p. 100 à PE	∞
5. Cobaye.	Acidalbuminoïde de mouton chauffé à 80 degrés + VF 1 p. 100	∞
6. Cobaye.	Le même, chauffé à 100 degrés + VF 1 p. 100 . . .	∞
7. Cobaye.	Acétate de soude à 10 p. 100 + VF 1 p. 100	Rage.
8. Cobaye.	Sérum neuf traité comme le cerveau + VF 1 p. 100.	Rage.
9. Lapin.	Rate traitée comme le cerveau + VF 1 p. 100 . . .	Rage.

Cette propriété anti d'une substance protéique extraite du cerveau nous paraît susceptible d'expliquer plus d'un fait demeuré obscur dans l'étude de la rage. Ainsi nous avons vu qu'en soumettant la matière cérébrale à une pression de plusieurs centaines d'atmosphères, on obtient un liquide doué d'un pouvoir antirabique très appréciable. Ce mode de traitement rappelle une expérience assez curieuse de W. Barratt (8). Ce savant, ayant imaginé de soumettre à l'action de l'air liquide dans le broyeur de Mac Fadyan un cerveau rabique, s'aperçut qu'il perdait sa virulence au bout de quelques heures. Heller (9) reprit cette expérience et obtint des résultats semblables, que Barratt prétendit expliquer par une destruction mécanique du virus de la rage, hypothèse difficilement acceptable.

Les propriétés que nous avons découvertes dans le suc céré-

(1) Sans vouloir entrer ici dans une discussion d'ordre chimique, nous tenons seulement à rappeler les critiques formulées par Duclaux (ces *Annales*, t. VI) contre ces dénominations conventionnelles de la matière albuminoïde, une même substance ayant peut-être reçu, en raison de certaines réactions, des noms très différents. Est-il besoin de faire remarquer en outre que les propriétés d'un albuminoïde isolé après la mort ne peuvent donner qu'une idée approchée de l'énergie qu'il possède dans le cerveau vivant.

bral nous conduisent à proposer de cette expérience une toute autre interprétation. En effet, on peut admettre que l'action mécanique du broyage a libéré, par suite d'une destruction profonde des éléments nerveux, la substance active, antirabique, de même que leur compression à plusieurs centaines d'atmosphères l'avait mise en liberté dans notre mode de préparation. Barratt signale, il est vrai, une série d'essais desquels il conclut que la perte de la virulence n'est pas due à un pouvoir antirabique de la masse broyée, mais ils ne sont rien moins que probants : d'une part, il recherche si cette dernière exerce une action neutralisante sur une émulsion virulente décimale, donc beaucoup trop concentrée ; d'autre part, il faut se rappeler que la substance active n'a pas été isolée par le broyage, mais est restée au sein de la masse, fixée sur le virus. Pour isoler cette substance, on doit faire subir à la matière nerveuse la préparation que nous avons décrite et qui nous a permis d'obtenir le principe antirabique du cerveau sous la forme d'un nouvel albuminoïde cérébral.

Cette forme sous laquelle nous le préparons lui permet d'échapper aux processus de coagulation par la chaleur qui pourraient lui enlever ses propriétés antirabiques ; aussi peut-on chauffer l'acidalbuminoïde à 80 et même à 100 degrés sans lui voir perdre son pouvoir neutralisant.

La dessiccation paraît avoir sur notre substance une action plus intense que sur les extraits cérébraux, sur le suc de presse, qui renferment le principe actif. A plusieurs reprises, nous avons pu comparer l'action sur l'émulsion rabique d'un même précipité isolé du cerveau normal avant et après sa dessiccation sous le vide sulfurique et ainsi constater que cet albuminoïde en se desséchant avait perdu une partie de ses propriétés neutralisantes.

Ces faits sont intéressants, car ils se rapportent aux résultats opposés que l'on obtient suivant que les moelles rabiques sont desséchées lentement d'après le procédé de Pasteur, ou bien d'une façon rapide ; on sait que, dans ce dernier cas, elles conservent intacte leur virulence.

Harris et Shackell (de Saint-Louis, États-Unis) ont repris (10) récemment cette question, sur laquelle ils professent les mêmes idées que nous. Ce n'est pas la dessiccation des moelles qui at-

ténue leur virulence, mais bien la façon dont elle est conduite : menée rapidement, elle n'altérera pas l'activité du virus; abandonnée lentement à elle-même, elle le neutralisera peu à peu en déterminant une concentration croissante du principe antirabique contenu normalement dans la substance nerveuse.

La perte de la virulence, dans le procédé des moelles pasteuriennes, est donc de nature chimique et c'est en s'opposant à l'action de l'albuminoïde actif sur le virus que la dessiccation brusque lui conserve tout son pouvoir infectant. Nos recherches sur les propriétés biologiques des albuminoïdes du cerveau apportent, pensons nous, une confirmation expérimentale à cette manière de voir.

Il était indiqué de rechercher ce que deviennent les propriétés spécifiques de l'acidalbuminoïde cérébral chez les animaux ayant succombé à la rage ainsi que chez ceux vaccinés contre elle. Déjà nous avons constaté une activité plus grande dans les extraits cérébraux chez une personne ayant succombé à la rage. Nos recherches sur l'acidalbuminoïde, qui ont porté sur plus de 80 expériences, concordent toutes pour révéler le fait suivant extrêmement suggestif : le pouvoir neutralisant de cette substance isolée du cerveau, assez faible chez l'animal neuf, augmente chez celui qui a succombé à l'infection rabique, et acquiert une énergie considérable chez les animaux vaccinés contre la rage. Ainsi, tandis que l'acidalbuminoïde extrait du cerveau de mouton neuf rend inactif environ son volume d'une émulsion centésimale de virus fixe, on voit la même quantité de cet acidalbuminoïde préparé avec la substance nerveuse d'un mouton rabique neutraliser 5 ou 6 volumes de la même dilution virulente. Mais du cerveau des animaux vaccinés on peut isoler un albuminoïde autrement actif; en voici quelques exemples.

Un mouton traité depuis plusieurs années par des injections hebdomadaires de virus fixe a fourni un extrait cérébral dont une partie neutralisait 15 parties de l'émulsion virulente centésimale. Chez un autre animal de la même espèce, nous avons pu isoler du cerveau la même substance douée, cette fois, d'une énergie surprenante, puisqu'elle neutralisait 40 fois son volume de la dilution virulente ; le sérum de ces deux moutons était extrêmement actif (11).

TABLEAU III

ACTION NEUTRALISANTE DE L'ACIDALBUMINOÏDE EXTRAIT DE CERVEAUX D'ANIMAUX RABIQUES ET D'ANIMAUX VACCINÉS CONTRE LA RAGE.

ANIMAUX	INOCULATION INTRACÉRÉBRALE	RÉSULTATS
1. Cobaye.	Acidalbuminoïde de cerveau de lapin rabique + VF 1 p. 100 PE	∞
2. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde de cerveau de mouton rabique + 3 parties VF 1 p. 100.	∞
3. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde du cerveau de mouton rabique + 6 parties VF 1 p. 100	∞
4. Lapin.	1 partie d'acidalbuminoïde du cerveau de mouton vacciné + 10 parties VF 1 p. 100	∞
5. Lapin.	1 partie du même acidalbuminoïde + 17 parties VF 1 p. 100.	Rage.
6. Cobaye.	1 partie d'acidalbuminoïde d'un autre mouton vacciné + 20 parties VF 1 p. 100	∞
7. Lapin.	1 partie du même acidalbuminoïde + 40 parties VF 1 p. 100	∞

Après avoir établi l'activité de l'acidalbuminoïde chez les animaux ayant acquis une immunité artificielle, il était intéressant de l'étudier chez des espèces qui jouissent d'un certain état réfractaire à la rage. Nous avons montré (12) que les oiseaux adultes rentrent dans cette catégorie d'animaux : un très petit nombre seulement présentent une ou plusieurs attaques de paralysie longtemps après la trépanation, quelques-uns même peuvent guérir définitivement.

Or, si l'on prépare notre substance albuminoïde en partant du cerveau de poules neuves, on constate qu'elle se montre plus active que chez les mammifères normaux. Dans nos essais, elle neutralisait de 4 à 5 fois son volume d'émulsion rabique. De ces faits, nous rapprocherons nos autres observations faites à propos de l'étude de la rage chez les oiseaux : état d'immunité naturelle très prononcé, guérison définitive d'un certain nombre des animaux paralysés, impossibilité d'obtenir un sérum antirabique très actif chez les oiseaux.

Pour rappeler le pouvoir neutralisant du virus rabique par la substance albuminoïde que nous avons isolée du cerveau, nous proposons de lui donner provisoirement le nom d'*antilyssine* (de *αντι* et *λὔσσα*, rage).

Son pouvoir spécifique est en effet très étroit. Son action sur la toxine tétanique est nulle : qu'il s'agisse de substance cérébrale ou médullaire d'animaux neufs ou tétaniques, ou même d'animaux immunisés contre le tétanos, en aucun cas nous n'avons observé la moindre atténuation de la tétanotoxine par l'albuminoïde actif sur le virus de la rage.

Voici un autre exemple de la spécificité d'action de cette substance. On sait que le virus de la poliomyélite se rapproche par certains traits du virus rabique; mais, de même que du sérum antirabique reste sans influence sur le virus de la maladie de Heine-Medin, de même aussi l'albuminoïde extrait de cerveau humain et si actif sur le virus de la rage n'exerce pas la plus légère action sur celui de la poliomyélite (13) (1).

II. — Propriétés toxiques.

Après avoir étudié les propriétés neutralisantes spécifiques des extraits cérébraux, il nous faut maintenant montrer que, dans certaines conditions, les albuminoïdes de la substance nerveuse sont doués d'un pouvoir toxique plus ou moins intense.

Le point de départ de nos recherches avait été l'observation suivante, déjà ancienne (14) : quand on injecte à des animaux des émulsions de matière cérébrale filtrées sur bougie, ils en sont fortement éprouvés, perdent rapidement de leur poids et succombent parfois dans un état marastique. Nous avions alors montré le premier (15) que si l'on précipite en masse par le sulfate d'ammoniaque pur les albuminoïdes d'une émulsion de cerveau filtrée sur bougie, on obtient une substance qui, injectée dans l'encéphale, après dialyse, se montre fortement toxique pour les animaux : ils succombent, souvent après avoir présenté des phénomènes convulsifs survenant par crises et d'une incubation variable.

De même, le suc cérébral que l'on prépare en soumettant un encéphale à l'action d'une presse peut être, comme nous l'avons indiqué, desséché et repris par l'eau de façon à avoir une solution isotonique qui, filtrée sur bougie Chamberland, se montre également douée d'un pouvoir toxique, variable suivant

(1) L'acidalbuminoïde cérébral n'exerce aucune action neutralisante sur un autre microorganisme « invisible », celui de la vaccine.

sa provenance. Ainsi, l'extrait d'un cerveau rabique, celui d'encéphale de paralytiques généraux, se montrent incomparablement plus toxiques que d'autres.

Enfin, dans notre procédé d'extraction des nucléoprotéines du cerveau, on obtient encore des substances douées d'une toxicité souvent élevée.

Qu'il s'agisse donc d'une précipitation en masse par le sulfate d'ammoniaque, du suc de presse ou de préparations nucléoprotéiniques, toujours on constate que ces différentes préparations exercent sur les animaux un pouvoir toxique plus ou moins élevé, assez comparable dans ses effets.

Pour tenter de l'analyser, nous avons entrepris son étude en suivant la technique définie ci-dessus pour l'obtention de notre acidalbuminoïde. De la sorte, nous avons pu nous convaincre, au moyen d'injections intracérébrales, de la toxicité présentée par les différentes formes sous lesquelles ce procédé nous offre la matière albuminoïde du cerveau.

Le point essentiel de ces recherches nous paraît être le suivant : les préparations sont nettement plus toxiques avec un cerveau rabique qu'avec un cerveau normal. De même nous avons pu constater, à plusieurs reprises, que l'acidalbuminoïde extrait d'encéphales de paralytiques généraux, et de celui d'une épileptique morte en état de mal, était beaucoup plus toxique; dans ces derniers cas, le caractère convulsif des troubles présentés par les animaux fut des plus accusés et d'une durée inaccoutumée.

Ici, une objection se présente immédiatement. Le concept toxicité est quelque chose de très relatif ; quand il s'agit d'inoculations dans un organe aussi sensible que le cerveau, et lorsque la substance ne se montre active pour l'organisme qu'après un tel mode d'introduction, on ne saurait rien conclure de précis, à moins de pouvoir provoquer les accidents spécifiques d'empoisonnement avec des quantités tout à fait minimes, ce qui n'est pas le cas pour nos extraits qui se montrent actifs aux doses relativement élevées de 0,50, 0,25, 0,10 cent. cubes.

L'étude des propriétés toxiques des albuminoïdes du cerveau offrirait donc peu d'intérêt si les choses se présentaient ainsi. Mais nous allons montrer que l'une de ces substances, le *nucléoprotéide* cérébral, est douée d'un pouvoir toxique en injection

intraveineuse, et que l'*acidalbuminoïde* du cerveau est susceptible de se comporter comme un antigène, qu'ainsi on peut obtenir un sérum capable de neutraliser ses propriétés.

Récemment, Dold, reprenant des expériences anciennes, a montré (16) que si l'on injecte dans les veines d'un lapin une émulsion concentrée du cerveau de cette espèce ou d'une autre, l'animal succombe en l'espace de quelques minutes, mais que si l'on a pris soin de chauffer l'émulsion à 60 degrés ou bien de l'additionner de sérum frais, l'animal n'éprouve aucun dommage de l'inoculation.

Nous allons prouver le rôle essentiel du *nucléoprotéide* du cerveau dans la genèse de ces accidents.

A un premier lot de lapins, on injecte dans les veines une dilution épaisse de substance cérébrale de la même espèce : ils meurent en quelques minutes. Un deuxième lot reçoit semblablement la même émulsion, chauffée une heure à 60 degrés : les animaux survivent, de même que ceux d'un troisième lot, inoculés avec une émulsion de cerveau additionnée d'un sérum (sérum antirabique).

Dans une deuxième expérience, l'émulsion de l'organe est remplacée par son nucléoprotéide préparé en la précipitant par l'acide acétique. Les lapins succombent trois-quatre minutes après avoir présenté les mêmes accidents que dans la première expérience ; ceux qui ont reçu le nucléoprotéide chauffé à 60 degrés résistent, de même que ceux injectés avec le mélange nucléoprotéide + sérum.

De ces expériences, il résulte que la toxicité des extraits aqueux du cerveau est due au nucléoprotéide (17).

Si maintenant on cherche à obtenir un sérum actif contre les propriétés toxiques de l'*acidalbuminoïde* du cerveau, on peut y parvenir à la condition de soumettre les animaux à des inoculations répétées à de courts intervalles. Un chien, qui avait reçu onze injections sous-cutanées de l'acidalbuminoïde de cerveau de mouton, a fourni un sérum (1) qui neutralisait non seulement les propriétés toxiques de cet albuminoïde, mais aussi son pouvoir antirabique.

L'étude des propriétés toxiques de l'acidalbuminoïde du cerveau, c'est-à-dire de la substance qui présente une affinité élective pour le virus de la rage, soulève la question de la toxine rabique.

Son existence n'a jamais été démontrée par la méthode expé-

(1) Ce sérum ne contient pas de précipitines, mais l'addition d'une minime quantité de l'acidalbuminoïde suffit pour y provoquer instantanément la formation d'un coagulum, phénomène rappelant les faits observés par Cantacuzène avec la pepsine (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXV, p. 271)

rimentale et les accidents qui ont été attribués à l'action de ce poison peuvent tout aussi bien l'être à celle des substances albuminoïdes de la matière nerveuse normale. D'autre part, ce que nous savons des propriétés fixatrices du cerveau vis-à-vis d'une toxine, celle du tétanos, nous porte à supposer que le poison rabique doit être retenu par les cellules cérébrales assez énergiquement pour résister à tout mode d'extraction connu.

Si la méthode expérimentale n'est pas encore parvenue à démontrer la présence de la toxine rabique, l'étude clinique de cette psychose aiguë qu'est la rage nous révèle toute une symptomatologie extrêmement complexe et difficilement explicable sans l'hypothèse d'un poison spécifique. L'évolution même de la maladie à la suite d'une trépanation impose l'idée d'une toxine : ainsi, dès le troisième jour, après une injection intracérébrale de virus fixe, on peut constater la virulence du bulbe, et cependant l'animal manifestera seulement cinq jours plus tard les premiers symptômes visibles consistant en ataxie, tremblement de la tête, excitation ou torpeur, signes témoignant incontestablement d'une action d'un poison sur les centres. Or, puisque nous savons maintenant que l'encéphale renferme un albuminoïde doué *in vitro* d'une grande affinité pour le virus, nous sommes conduit logiquement à supposer que cette même substance doit l'exercer aussi dans le cerveau vivant.

Au moment de la culture du microbe rabique dans les centres, on peut supposer que certains éléments cellulaires de l'encéphale, neurones ou cellules de la névroglie (1), vont réagir en produisant un excès de l'albuminoïde, et c'est ce qui explique pourquoi l'on trouve celui-ci en plus grande quantité dans les cerveaux rabiques. Une partie de cet excès d'albuminoïde pourra, soit par son action sur les microbes rabiques libérer leur toxine, soit en se combinant avec elle, provoquer l'ensemble des symptômes que les auteurs ont, avec raison, considérés comme ceux d'une intoxication nerveuse spécifique.

(1) van Gehuchten est porté à considérer comme une réaction de défense du neurone les lésions de chromatolyse (si intenses dans la rage), centrale et périphérique, sans qu'il puisse dire s'ils sont primitifs ou secondaires. (*Anatomie du système nerveux*, t. I, p. 339.)

D'autre part, J. Mawas (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 2 juillet 1910, p. 45), tend à reconnaître une structure et une signification glandulaires aux cellules névrogliques chez les vertébrés.

S'il en est ainsi, si la présence d'un excès de cette substance albuminoïde dans le cerveau à un moment donné de l'incubation rabique joue un certain rôle dans l'éclosion des accidents toxiques, c'est-à-dire des signes visibles de la rage, ne pourrait-on pas hâter leur apparition, les provoquer à une époque où ils n'existent pas encore d'ordinaire chez les animaux qui ont reçu du virus dans l'encéphale?

On injecte à deux lapins et à deux cobayes un peu de cerveau de passage sous les méninges ; quatre jours plus tard, ces animaux reçoivent dans la même région (1) une quantité d'acidalbuminoïde très inférieure à la dose toxique, et que l'on inocule semblablement à deux lapins et à deux cobayes témoins. Ces derniers animaux ne présentent rien d'anormal consécutivement à l'injection ; au contraire, les lapins et les cobayes, qui avaient été infectés préalablement avec le virus fixe, sont pris, trois le lendemain et le quatrième au bout de quarante-huit heures, de titubation, de parésie, de tremblement de la tête, puis graduellement des signes de la rage confirmée à laquelle ils succombent dans les délais normaux. Ainsi, tandis que les symptômes rabiques n'éclatent jamais avant le 8[e] jour après la trépanation, l'inoculation d'une dose, inoffensive par elle-même, de l'acidalbuminoïde a suffi pour les faire apparaître plusieurs jours avant l'échéance normale. Mais ces faits ne se passent pas toujours avec la même régularité et leur déterminisme nous échappe en partie.

L'hypothèse, que nous venons de formuler et que l'expérience paraît confirmer, tend à considérer une substance, élaborée dans un but de protection des éléments nobles, comme participant elle-même à la genèse des accidents rabiques ; autrement dit, l'action de l'albuminoïde, neutralisante *in vitro*, serait, au sein de l'organisme, favorisante de la toxi-infection.

Dans nos expériences de neutralisation du virus par la substance active, nous n'avons jamais observé de phénomènes toxiques résultant de l'inoculation des mélanges neutres virus + acidalbuminoïde, excepté dans certains cas où nous faisions usage d'extraits cérébraux préparés avec l'encéphale d'animaux hyperimmunisés : la substance albuminoïde active

(1) Une deuxième trépanation n'a aucune action fâcheuse pour les animaux.

existant dans leur cerveau en plus grande quantité, il en persistait une dose suffisante pour être toxique. On est donc amené à se demander comment ces animaux hypervaccinés ne sont pas eux-mêmes intoxiqués par le développement d'une substance douée d'une aussi grande activité. La réponse à cette question, qui pourrait se poser pour d'autres produits toxiques de l'organisme, est fournie par ce fait, déjà signalé plus haut, que l'acidalbuminoïde se comporte comme un antigène et que l'on peut accoutumer à son action des animaux dont le sérum finit ainsi par acquérir un pouvoir spécifique à la fois contre la toxicité et contre les propriétés antirabiques de cette substance.

On prépare deux mélanges à P. E., le premier de l'acidalbuminoïde de mouton et de sérum de chien neuf, le deuxième du même acidalbuminoïde et de sérum de chien immunisé contre lui. Après vingt-quatre heures de séjour à la glacière, on ajoute à chaque mélange la moitié de son volume de virus fixe au centième et on inocule les deux préparations dans le cerveau de deux lots de lapins; ceux au sérum neuf demeurent bien portants, ceux au sérum du chien traité par l'acidalbuminoïde prennent la rage sans retard : le sérum renfermait donc un anticorps de l'albuminoïde cérébral (17).

Cette propriété du sérum d'un animal traité par cette substance nous paraît être d'importance, car, en même temps qu'elle précise l'action spécifique de l'acidalbuminoïde, elle permet d'expliquer comment la vie des animaux immunisés contre la rage est compatible avec la présence d'une substance aussi active, si bien qu'ils se trouvent en quelque sorte vaccinés contre elle et qu'en définitive il doit en résulter pour eux l'état d'équilibre organique nécessaire.

Au cours de l'immunisation contre la rage, il se produit des phénomènes nécessairement complexes parmi lesquels nous constatons, dans le temps : une réaction leucocytaire puissante, l'apparition des propriétés antirabiques dans les humeurs, enfin chez les animaux soumis à des vaccinations prolongées, celle de l'immunité cellulaire, active, de leur cerveau.

Quelles sont les relations qui existent entre les deux premiers et le dernier de ces actes? Nous ne sommes pas en état de le dire, mais seulement ceci. Quant on soumet à l'épreuve de la trépanation une série d'animaux vaccinés contre la rage, la plupart d'entre eux succombent à l'infection rabique bien que leur sérum soit souvent très actif. Quelques-uns résistent à cette épreuve ; chez eux la cellule nerveuse est

pour longtemps immunisée et le virus introduit dans leur cerveau paraît bien s'y trouver détruit. N'est-il pas logique d'admettre que l'albuminoïde spécifique, impuissant chez l'animal neuf ou insuffisamment vacciné, à s'opposer longtemps à la culture du virus rabique, s'est, au cours d'une immunisation prolongée, développé au point de devenir efficace au sein de l'encéphale lui-même? Dans cette hypothèse, le microbe de la rage ne trouve plus dans le cerveau des animaux hyperimmunisés un milieu de culture favorable, mais se trouve soumis à une digestion par certains éléments cellulaires de l'encéphale et à une destruction par l'acidalbuminoïde. La proportion de cette substance, énorme relativement à la petite quantité de virus introduit au sein du cerveau chez les animaux hyperimmunisés que l'on soumet à l'épreuve de la trépanation, expliquerait pourquoi la destruction du virus par l'acidalbuminoïde ne s'accompagne pas généralement des accidents toxiques que nous avons supposés résulter de l'action exercée par lui sur la substance rabique.

L'activité si considérable que nous avons constatée dans les extraits du cerveau des animaux vaccinés nous paraît donc capable d'expliquer en partie le mécanisme de l'immunité acquise par l'encéphale, immunité que l'on a vue durer bien au delà des propriétés antirabiques des humeurs.

OUVRAGES CITÉS.

(1) A. Marie et M. Tiffeneau, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXII, p. 289 et 644, et t. XXVI, p. 318.
(2) A. Marie, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LV, p. 1290.
(3) Remlinger, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XII, p. 834.
(4) A. Marie, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLIX, p. 234.
(5) Halliburton, *Journ. of physiology*, t. XV, p. 90.
(6) Levene, *Arch. neur. et psych.*, t. II, I. 1899,
(7) A. Marie, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CL, p. 1775, et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXX, p. 332.
(8) W. Barratt, *Proc. Roy. Soc.* t. LXXII, p. 353.
(9) Otto Heller, *Die Schutzimpfung gegen Lyssa*. Fischer, Iena.
(10) Harris et Shackell, *Journ. of inf. dis.*, t. VIII, p. 47.
(11) A. Marie, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, p. 1514 et *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXI, p. 709.
(12) A. Marie, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LVI, p. 573.
(13) Levaditi, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, 25 novembre 1911.
(14) A. Marie, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LV, p. 1290.
(15) A. Marie, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLI, p. 394.
(16) Dold, *Zeits. f. Immun. u. exp. Therapie*, t. X, p. 53.
(17) A. Marie, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXII, p. 100 et 528.

ÉTUDES SUR LES ENGRAIS CATALYTIQUES

par E. BOULLANGER

Depuis le jour où G. Bertrand et Thomassin ont fait connaître les résultats remarquables obtenus en grande culture par l'emploi du sulfate de manganèse comme engrais, de nombreuses expériences ont été entreprises sur les engrais manganésés et sur d'autres engrais catalytiques en France, en Allemagne, en Suède, en Belgique, en Hollande, en Italie, au Japon : elles ont conduit le plus souvent à des résultats favorables; cependant certains expérimentateurs n'ont obtenu que des résultats négatifs.

Il nous a semblé intéressant de faire l'étude de cette question au moyen des méthodes très précises de la culture en pots, car ces méthodes permettent de placer tous les essais dans des conditions rigoureusement identiques, de les rendre ainsi parfaitement comparables, d'éliminer les influences perturbatrices des variations atmosphériques et de multiplier enfin les essais pour avoir d'un seul coup une vue d'ensemble sur les modifications de la récolte sous l'action des engrais catalytiques.

Les méthodes de cultures en pots que nous avons adoptées sont celles du professeur Wagner, de Darmstadt, qui sont suffisamment connues des agronomes pour qu'il soit inutile de les décrire ici.

Nos expériences ont porté d'abord, en 1908, sur les pommes de terre, et nous avons expérimenté avec le chlorure de manganèse sur deux terres différentes, une terre pauvre, siliceuse, et une terre riche, argileuse. Les engrais ont été incorporés directement à la terre au moment de la préparation de chaque pot. Seul, le chlorure de manganèse a été dissous dans un litre d'eau et la terre a été arrosée avec ce liquide. Les résultats fournis par cet essai sont réunis dans le tableau suivant : les chiffres correspondent à la récolte moyenne d'un pot (moyenne des six pots que comportait chaque série).

	POIDS DES TUBERCULES en grammes	
	Terre pauvre.	Terre riche.
1° Sans engrais et sans $MnCl^2$	438	682
2° $MnCl^2$ seul : 1 gr. par pot	468	903
3° $SO^4(AzH^4)^2$: 20 gr.; KCl : 8 gr.; superphosphate : 30 gr. par pot	832	892
4° Engrais complet de la 3e série, plus 1 gr. de $MnCl^2$ par pot	1115	981

Poids de la terre employée pour chaque pot : 40 kil.

On voit que le chlorure de manganèse a augmenté partout le poids de la récolte, mais cette augmentation se manifeste différemment dans la terre pauvre et dans la terre riche. Dans la terre pauvre et en l'absence d'engrais, le chlorure de manganèse n'a donné qu'une augmentation de récolte assez faible sur le témoin; au contraire, en présence d'engrais complet, l'augmentation de rendement a été considérable, puisqu'elle atteint 34 p. 100 sur la série correspondante sans manganèse. Dans la terre riche, l'action du manganèse a été très nette, même en l'absence d'engrais; le manganèse seul, sans autre engrais, donne en effet une augmentation de récolte de plus de 32 p. 100 sur le témoin sans manganèse; en présence d'engrais complet, le manganèse a encore exercé une action, mais plus faible, car l'accroissement de récolte n'est plus que de 10 p. 100 environ sur la série correspondante sans manganèse.

Ces faits semblent montrer que le manganèse, qui permet une utilisation plus active des éléments fertilisants du sol, agit différemment suivant la richesse des sols en ces éléments. Si le sol est pauvre, l'influence du manganèse reste faible et elle n'apparaît nettement que lorsqu'on ajoute au sol les éléments fertilisants qui lui manquent. Si le sol est riche, le manganèse agit aussitôt puisque la plante peut disposer d'aliments abondants; en présence de fortes doses d'engrais, il y a encore accroissement de récolte sous l'influence du manganèse, mais cet accroissement est proportionnellement plus faible, car il y a évidemment une limite à l'assimilation par la plante.

Ces expériences sur les pommes de terre ont été reprises un peu différemment en 1909, sur une terre riche, dont chaque pot a reçu 40 kilogrammes. Les résultats obtenus sont réunis

dans le tableau suivant, dont les chiffres indiquent le rendement d'un pot, en prenant la moyenne des six essais de chaque série.

	POIDS DES TUBERCULES en grammes.
1° Sans engrais	334
2° $MnCl^2$ seul : 2 gr. par pot	462
3° $SO^4(AzH^4)^2$ seul : 15 gr. par pot	455
4° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; $MnCl^2$: 2 gr. par pot	524
5° $SO^4(AzH^4)^2$: 16 gr.; superphosphate : 25 gr. par pot.	500
6° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; superphosphate : 25 gr.; $MnCl^2$: 2 gr. par pot	592
7° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; KCl : 7 gr. par pot	520
8° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; KCl : 7 gr.; $MnCl^2$: 2 gr. par pot.	600
9° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; KCl : 7 gr.; superphosphate : 25 gr. par pot	674
0° $SO^4(AzH^4)^2$: 15 gr.; KCl : 7 gr.; superphosphate : 25 gr.; $MnCl^2$: 2 gr. par pot	760

Les résultats obtenus dans ces expériences confirment ceux de l'année précédente. L'augmentation de récolte se manifeste dans tous les cas, mais, comme dans les expériences de 1908, elle est proportionnellement moins élevée en présence qu'en l'absence d'engrais.

D'autres essais ont été entrepris en 1909 sur l'action du manganèse, sur l'orge de brasserie. Nous avons employé la même terre riche que pour nos expériences sur les pommes de terre ; on en a placé 7 kilogrammes dans chaque pot. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant ; ils représentent le rendement moyen d'un pot dans chaque série.

	POIDS DU GRAIN en grammes.	POIDS DE LA PAILLE en grammes.
1° Sans engrais	10,5	16,5
2° $MnCl^2$ seul : 0,15 gr. par pot	9,8	17,4
3° KCl : 1,6 gr. par pot	11,4	17,0
4° KCl : 1,6 gr.; $MnCl^2$: 0,15 gr. par pot	10,4	17,6
5° KCl : 1,6 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 4 gr. par pot.	21,05	37,0
6° KCl : 1,6 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 4 gr.; $MnCl^2$: 0,15 gr. par pot	20,4	38,1
7° KCl : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr. par pot	12,5	18,5
8° KCl : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $MnCl^4$: 0,15 gr. par pot	11,4	18,7
9° KCl : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 4 gr. par pot	22,2	43,9
10 KCl : 1,6 gr.; superphosphate : 6 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 4 gr ; $MnCl^2$: 0,15 gr. par pot.	25,95	49,7

Ces chiffres montrent que l'action du chlorure de manganèse sur l'orge de brasserie a été nulle dans la plupart des cas. La récolte en grain est même en général un peu inférieure, avec addition de manganèse, à celle des témoins sans manganèse. L'inverse se produit pour les récoltes en paille, mais les différences sont très faibles. Le manganèse ne semble avoir agi qu'en présence de l'engrais complet, où on observe un excédent de récolte de près de 17 p. 100 pour le grain, et de 13 p. 100 pour la paille. Mais il ne faut pas perdre de vue que ces méthodes de cultures en pots réalisent en quelque sorte des conditions idéales de culture, et fournissent toujours des résultats amplifiés ; en pratique, l'augmentation de récolte serait beaucoup moins considérable.

Une nouvelle série d'expériences a été entreprise en 1910, et a porté sur l'avoine, les pois et le trèfle. Dans ces expériences, nous avons utilisé, au lieu du chlorure de manganèse, les engrais manganésés des mines de Las Cabesses (Ariège), et notamment le manganose et la chaux manganésée. Les essais ont eu lieu sur une terre argileuse riche : chaque pot en a reçu 7,5 kilogs. Des expériences préliminaires et très réduites, entreprises l'année précédente, avaient semblé indiquer que le manganèse exerçait une action favorable surtout en présence des engrais potassiques : nous avons donc particulièrement dirigé nos études dans cette voie.

1° *Expériences sur l'avoine.* — Dans cette série, tous les engrais, azotés, phosphatés, potassiques ou manganésés ont été incorporés directement à la terre de chaque pot au moment de la préparation du pot. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant, dont les chiffres donnent la récolte moyenne d'un pot dans chaque série.

L'influence des engrais manganésés est très nette et se manifeste partout. L'augmentation de rendement est en général assez faible pour la paille; elle atteint cependant 17 p. 100 avec le manganose seul sur la série sans engrais, et dépasse 12 p. 100 avec la chaux manganésée en présence d'engrais potassique sur la série correspondante sans chaux manganésée. Mais en présence d'engrais complet, l'accroissement de la récolte de paille est faible. L'influence des engrais manganésés est beaucoup

plus forte sur la récolte de grain, ce qui est bien conforme aux résultats de G. Bertrand. L'augmentation de la récolte de grain sous l'action du manganèse, déjà sensible dans la série sans engrais et dans la série avec engrais potassique seul, où elle atteint 15 à 22 p. 100, devient considérable en présence d'engrais potassique et d'engrais azoté (plus de 45 p. 100) ou en présence d'engrais complet (27 p. 100 pour le manganose, 41 p. 100 pour la chaux manganésée).

	POIDS DU GRAIN en grammes.	POIDS DE LA PAILLE en grammes.
1° Sans engrais	4,2	22,2
2° Manganose seul : 1 gr. par pot	5,0	26,15
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot	4,6	24,3
4° KCl : 0,5 gr. par pot	5,3	20,75
5° KCl : 0,5 gr.; manganose : 1 gr. par pot	6,1	21,2
6° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	6,0	23,2
7° KCl : 0,5 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr. par pot	5,1	31,45
8° KCl : 0,5 gr.: $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot	7,4	31,75
9° KCl : 0,5 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	7,55	32,10
10° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr. par pot.	5,05	22,3
11° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot	6,15	24,2
12° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	6,25	23,8
13° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr. par pot	5,95	32,0
14° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot	7,6	32,8
15° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.: chaux manganésée : 1 gr. par pot	8,45	32,6

2° *Expériences sur les pois.* — Nous avons employé, pour ces essais, des pois nains qui viennent parfaitement en pots. On s'est borné à déterminer la récolte de pois écossés, qu'on a fait sécher avant de les peser. Les résultats obtenus ont été les suivants.

Ces expériences nous amènent aux mêmes conclusions que les expériences sur les avoines; mais l'influence du manganèse est encore plus considérable ici. On voit, en effet, que dans les séries 4, 5, 6, 10, 11, 12, la récolte peut être doublée par le

manganèse, sans aucun apport d'engrais azoté. En présence d'engrais azoté, les accroissements de récolte, quoique toujours élevés, sont cependant moins considérables. On voit que la simple addition de manganose ou de chaux manganésée aux engrais potassiques, permet d'obtenir un rendement presque aussi élevé qu'avec l'engrais complet sans manganèse.

	POIDS DES GRAINS en grammes.
1° Sans engrais	2,25
2° Manganose seul : 1 gr. par pot	3,05
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot	3,35
4° KCl : 0,5 gr. par pot	2,25
5° KCl : 0,5 gr.: manganose : 1 gr. par pot	4,25
6° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	4,50
7° KCl : 0,5 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr. par pot	5,00
8° KCl : 0,5 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot	5,90
9° KCl : 0,5 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	6,00
10° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr. par pot	2,25
11° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot	4,40
12° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	4,80
13° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$ 1 gr. par pot.	5,20
14° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot	5,60
15° KCl : 0,5 gr.; superphosphate : 2 gr.; $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	6,10

3° *Expériences sur le trèfle.* — Ces expériences ont été faites avec le trèfle blanc, sur 7 kil. 5 de terre. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant, dont les chiffres indiquent le poids moyen de la récolte sèche d'un pot de chaque série :

	POIDS DE LA RÉCOLTE SÈCHE en grammes.
1° Sans engrais	20,30
2° Manganose seul : 1 gr. par pot	20,30
3° Chaux manganésée seule : 1 gr. par pot	20,00
4° $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr. par pot	19,90
5° $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; manganose : 1 gr. par pot	19,90
6° $SO^4(AzH^4)^2$: 1 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	20,50
7° Superphosphate de chaux : 2 gr. par pot	20,10
8° Superphosphate : 2 gr.; manganose : 1 gr. par pot	20,05
9° Superphosphate : 2 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	20,05
10° KCl : 0,5 gr. par pot	22,20
11° KCl : 0,5 gr.; manganose : 1 gr. par pot	26,70
12° KCl : 0,5 gr.; chaux manganésée : 1 gr. par pot	30,60

Nous voyons que les engrais manganésés n'ont exercé aucune action sensible, soit seuls, soit en présence d'engrais azoté ou d'engrais phosphaté. Mais l'action en présence d'engrais potassique est très accentuée puisque la récolte augmente de 20 p. 100 avec le manganose et de 37 p. 100 avec la chaux manganésée. Nous retrouvons donc ici une action analogue à celle que nous avons observée pour l'avoine et pour les pois, où les engrais manganésés ont surtout agi en présence des engrais potassiques. Ces résultats expliquent en outre certains insuccès qu'on peut avoir dans l'emploi des engrais manganésés : on voit que le manganèse n'agit pas toujours et qu'il est nécessaire, pour que son action se manifeste, que certaines conditions de nutrition minérale, variables, sans doute, avec les diverses cultures, soient réalisées. En général, la présence d'engrais potassiques paraît être un adjuvant de l'action du manganèse.

Les études qui précèdent nous ont engagé à étendre, dans le cours de l'année 1911, nos recherches sur les engrais manganésés à certaines plantes potagères et à y joindre l'étude d'autres substances telles que le sulfate d'alumine, le silicate de soude, le sulfate ferrique, le sulfate d'uranium et le soufre en fleur. Cette étude a porté sur les carottes, les haricots, les céleris, les laitues, les oseilles, les chicorées, les pommes de terre, les oignons et les épinards.

Pour les carottes, les haricots et les céleris, les expériences ont été divisées en quatre séries : la première n'a reçu aucun engrais, la seconde n'a reçu comme engrais qu'un des engrais catalytiques signalés plus haut, la troisième a reçu un engrais complet composé, pour 30 kilogrammes de terre, d'un gramme d'azote sous la forme de sulfate d'ammoniaque, d'un gramme d'acide phosphorique sous la forme de superphosphate de chaux et d'un gramme de potasse sous la forme de chlorure de potassium ; la quatrième a reçu le même engrais complet, additionné d'un des engrais catalytiques énumérés précédemment. Les doses d'engrais catalytiques ont été de 1 gramme pour 30 kilogrammes de terre, sauf pour le soufre en fleur où la dose a été seulement de 0 gr. 7. Pour les autres cultures, les essais n'ont porté que sur les deux premières séries, à cause du matériel considérable que demandent de semblables études.

L'engrais complet et le soufre ont été incorporés directement à la terre au moment de la préparation de chaque pot : les engrais catalytiques ont été ajoutés en solution dans les 500 cent. cubes d'eau d'arrosage, avant les semailles. Pour chaque essai, on a disposé plusieurs pots semblables, afin d'avoir une mesure plus certaine de l'influence moyenne de chaque substance.

Les résultats obtenus dans ces divers essais sont réunis dans les tableaux suivants. Ils sont évalués en grammes par pot.

1° Sulfate d'alumine

	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais	560	17,9	360	79	133	137	218	84	207
Sulfate d'alumine sans engrais .	613	18,7	442	78	147	142	241	96	293
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	»
Sulf. d'alumine av. engrais comp.	749	19,5	537	122	»	»	»	»	»

2° sulfate de manganèse

	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Betteraves.
Témoin sans engrais	560	17,9	360	79	133	137	218	84	570
Sulf. de manganèse sans engrais.	626	15,8	464	86	190	176	212	88	711
Témoin avec engrais complet. .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	675
Sulf. de mang. av. engrais comp.	698	21,8	568	116	»	»	»	»	786

3° Silicate de soude

	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.		Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais.	560	17,9	360	79		137	218	84	207
Silicate de soude sans engrais. .	628	15,8	517	41		99	206	82	279
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109		»	»	»	»
Silic. de soude avec engrais com.	656	19,9	557	82		»	»	»	»

4° Sulfate de fer

	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Epinards.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais.	560	17,9	360	79	133	137	218	84	207
Sulfate de fer sans engrais . . .	555	16,8	550	70	162	77	192	96	273
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	109	»	»	»	»	»
Sulfate de fer avec engrais comp.	635	20,9	706	94	»	»	»	»	»

5° Soufre en fleur

	Carottes.	Haricots (grains).	Céleris.	Laitues.	Oseilles.	Chicorées.	Epinards.	Oignons.	Pommes de terre.
Témoin sans engrais.	560	17,9	360	133	137	218	79	84	207
Soufre sans engrais	646	19,5	635	246	222	266	96	95	249
Témoin avec engrais complet . .	615	19,7	398	»	»	»	»	»	»
Soufre avec engrais complet. . .	745	25,2	676	»	»	»	»	»	»

6° Sulfate d'uranium

	Betteraves
Témoin sans engrais	570
Sulfate d'uranium sans engrais.	645
Témoin avec engrais complet	675
Sulfate d'uranium avec engrais complet.	849

Nous pouvons tirer des expériences qui précèdent les conclusions suivantes :

L'action du sulfate d'alumine est considérable sur la carotte, le céleri et la pomme de terre, la chicorée et l'oignon ; elle est douteuse sur le haricot, l'épinard et l'oseille.

L'action du sulfate de manganèse est considérable sur la carotte, le céleri, la laitue, l'oseille et la betterave ; elle est sensible sur l'épinard, elle est douteuse ou nulle sur l'oignon, la chicorée et le haricot.

L'action du silicate de soude est considérable sur le céleri et

la pomme de terre, très sensible sur la carotte, nulle sur l'oignon et la chicorée, nuisible sur l'épinard et l'oseille.

L'action du sulfate de fer est considérable sur le céleri et la pomme de terre, sensible sur la laitue et l'oignon, nulle ou douteuse sur la carotte et le haricot, nuisible sur l'épinard, l'oseille et la chicorée.

L'action du soufre en fleur est favorable partout : elle est surtout considérable sur la carotte, le céleri, la laitue, l'oseille et la pomme de terre.

Enfin le sulfate d'uranium semble agir très favorablement sur la betterave.

Si nous envisageons maintenant chaque culture, nous pouvons grouper pour chacune d'elles les engrais catalytiques de la façon suivante, par ordre d'activité décroissante, en laissant de côté ceux qui n'agissent pas ou agissent défavorablement.

Carotte : soufre, sulfate d'alumine, sulfate de manganèse, silicate de soude.

Haricot : soufre.

Céleri : Soufre, sulfate de fer, silicate de soude, sulfate de manganèse, sulfate d'alumine.

Epinard : Soufre.

Laitue : Soufre, sulfate de manganèse, sulfate de fer, sulfate d'alumine.

Oseille : Soufre, sulfate de manganèse.

Chicorée : Soufre, sulfate d'alumine.

Pomme de terre : Sulfate d'alumine, silicate de soude, sulfate de fer, soufre. Nous avons vu dans la première partie de ce mémoire que les sels de manganèse agissent aussi très favorablement sur cette plante.

Oignon : légère action favorable avec le sulfate d'alumine. le sulfate de fer et le soufre.

Une dernière expérience a été faite pour chercher à déterminer le mécanisme par lequel le soufre en fleur exerce son action favorable.

Deux pots ont reçu, l'un 7 kilogrammes de terre, l'autre la même quantité additionnée de 0 gr. 16 de soufre en fleur. Deux autres pots ont été stérilisés au flambeur, ainsi que deux lots de 7 kilogrammes de terre : un de ces lots

a reçu, après stérilisation, 0 gr. 16 de soufre en fleur ; le mélange du soufre et de la terre a été fait dans une cuvette stérile et la terre a été placée ensuite dans un pot stérilisé ; l'autre lot de terre a été introduit directement, sans soufre, dans le second pot stérilisé et la terre a été ramenée, dans les deux pots, à son humidité normale avec de l'eau stérile. On a ensemencé les quatre pots avec des graines de cressonnette stérilisées. Les deux cultures en milieu stérilisé ont été placées sous de grandes cloches de verre également stériles ; elles ont été aérées dans le cours de l'expérience avec de l'air filtré sur coton, et arrosées avec de l'eau stérile. Les deux autres pots, en milieu non stérilisé, sont restés à l'air libre. Les récoltes ont été les suivantes.

	GRAMMES
Pot témoin, milieu non stérilisé.	15,50
Pot avec soufre, milieu non stérilisé	25,40
Pot témoin, milieu stérilisé	14,80
Pot avec soufre, milieu stérilisé	15,60

On voit que l'action du soufre est considérable en terre non stérilisée, et qu'elle est très faible en terre stérile. Il est donc probable que le soufre n'agit qu'indirectement en modifiant la flore bactérienne du sol et en entravant le développement de certains organismes. Nous procédons actuellement à de nouvelles expériences pour élucider le mécanisme de cette action du soufre.

DE LA VÉSICULE BILIAIRE ENVISAGÉE COMME LIEU D'INOCULATION

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ ET A LA PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE

par Henri VIOLLE
de la marine de guerre.

(Avec les planches XII et XIII.)

(Suite et fin.)

EFFETS FAVORABLES OU DÉFAVORABLES DE L'INTRODUCTION DANS LA VÉSICULE BILIAIRE DE SUBSTANCES CHIMIOTACTIQUES POSITIVES OU NÉGATIVES POUR LES LEUCOCYTES

Dans le but de reconnaître le rôle joué par l'afflux leucocytaire dans la vésicule, nous avons étudié l'effet de diverses substances ayant sur les globules blancs, les unes une action chimiotactique positive, les autres une action chimiotactique négative. Nous avons vu que l'adjonction à un milieu de culture de bouillon, d'eau peptonée, ou de glucose dans la proportion de 1 p. 100, en favorisant la leucocytose, aide puissamment à la production d'anticorps. Il en serait de même avec l'essence de térébenthine, mais celle-ci a une action bactéricide trop puissante pour qu'on puisse l'employer.

1° *Exemple :* Lapin, n° 73, inoculé le 5 octobre, reçoit dans la vésicule biliaire 1 centimètre cube d'eau physiologique contenant en suspension deux cultures de vibrions sur gélose de 24 heures à 37 degrés; on a ajouté à la dilution 6 gouttes de térébenthine.

L'agglutination, 10 jours après l'opération, s'élève à 1 p. 100. A l'autopsie, faite 20 jours après, on constate que la vésicule est très légèrement hypertrophiée, renfermant dans son intérieur des leucocytes; il n'y a pas de vibrions; par contre, la térébenthine est restée en très grande partie non résorbée.

2° *Exemple :* Lapin, n° 79, inoculé le 30 septembre, reçoit dans la vésicule 1/2 centimètre cube de térébenthine et 1/2 cen-

timètre cube de bouillon ensemencé extemporanément avec une culture cholérique.

Le sérum présente un taux agglutinatif s'élevant dans les 15 premiers jours à 1 p. 500, pour redescendre à 1 p. 50, 30 jours après. A l'autopsie, faite à cette époque : absence de vibrions dans la vésicule.

Lorsque nous avons étudié les anticorps (1), apparaissant à la suite d'inoculations intravésiculaires d'hématies de mouton, nous citions les résultats obtenus, toutes choses égales d'ailleurs, dans les cas suivants : le premier, où les hématies sont injectées seules en milieu isotonique (eau physiologique), le second, où elles sont en milieu chimiotactique négatif (acide lactique en solution à 1 p. 100), le troisième, où elles sont mélangées à des corps possédant un pouvoir chimiotactique positif (spores de charbon tuées). Les résultats sont conformes, dans ces trois cas, aux règles générales. Le pouvoir hémolytique du sérum, dans le premier cas, atteint 1 p. 10; dans le second, il reste égal à ce qu'il était auparavant; dans le troisième, il s'élève à 1 p. 100.

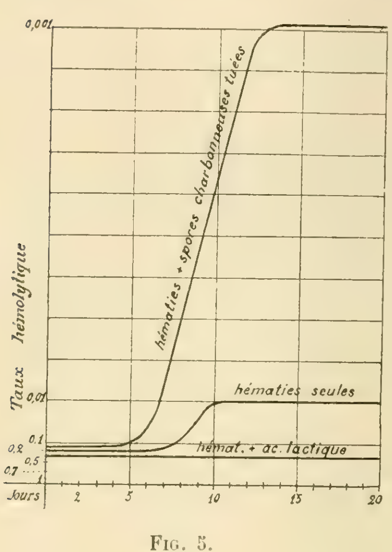


Fig. 5.

Mais si, dans l'exemple que nous avons pris précédemment, le fait d'ajouter une substance repoussant les leucocytes permet de comprendre pourquoi le pouvoir hémolytique reste invariablement au taux qu'il possédait antérieurement, puisque les hématies n'ont pas été détruites, il est difficile d'expliquer comment, avec une substance favorisante, le pouvoir hémolytique s'élève et devient supérieur à ce qu'il eût été sans l'adjonction de cette substance.

Peut-être faut-il admettre, ce qui semble d'accord avec les

(1) Voir *Thèse*, page 78.

constatations faites à l'autopsie, que, dans le premier cas, les leucocytes n'ont pas détruit intégralement toutes les hématies, tandis que, dans le second, cette désintégration a été complète, poussée jusqu'à la disparition totale de tout vestige hématique.

Inversement, les substances chimiotactiques négatives, en repoussant les leucocytes, empêcheront toute formation d'anticorps. L'addition de sels de quinine, d'acide lactique, etc., en quantité extrêmement faible, à la culture inoculée dans la vésicule, entravera l'élaboration, même minime, de substances immunisantes; et ces résultats sont constants, quel que soit l'antigène considéré : bactérien, cellulaire ou albumineux.

Les expériences venant à l'appui de cette hypothèse seront décrites en détail dans la deuxième partie de ce travail, principalement aux chapitres, « Choléra » et « Bacille tuberculeux ».

DEUXIÈME PARTIE

Ayant vu dans leur ensemble les modifications apportées dans les humeurs à la suite d'inoculations antigéniques intravésiculaires, nous allons, dans la deuxième partie de ce mémoire, nous arrêter plus spécialement sur quelques cas, et apprécier les transformations humorales subies par l'organisme, consécutivement à l'inoculation d'antigènes, soit bactériens, dont l'évolution dans l'organisme est rapide : *Vibrion cholérique*, *Bacille typhique*, *Coli-bacille*, ou moins intense : *Bacille tuberculeux*.

CHOLÉRA

Dans ce chapitre, nous dirons un mot des *Inoculations intraveineuses* de vibrion cholérique ; puis nous aborderons les *Inoculations intravésiculaires*, conférant l'immunisation active, et les *Inoculations intravésiculaires, suivies d'injections intraveineuses*, lesquelles contrôlent cette vaccination et permettent l'hyperimmunisation.

Nous terminerons par la description des *Propriétés du liquide vésiculaire*, et surtout des *Propriétés du sérum* : action de coagulation et de lyse *in vitro* et *in vivo* conférant l'immunité passive.

Inoculations intraveineuses.

Avec les cultures que nous avons utilisées (1), l'inoculation intraveineuse de vibrion cholérique (3/4 à 1 tube de culture sur gélose de 18 à 24 heures à 37 degrés, dilué dans quelques centimètres cubes d'eau physiologique) a toujours déterminé la mort chez le lapin adulte. La mort survenait généralement quelques heures après l'injection (2).

A l'autopsie, les lésions varient suivant que la mort est survenue très rapidement ou un certain temps après l'injection. Dans le premier cas, on ne constate aucune lésion; dans le second, on note une congestion intense uniforme de l'intestin grêle, à contenu diarrhéique, donnant à l'organe une coloration rose et rarement hortensia, une congestion légère du cæcum et de l'appendice, accompagnée de piqueté hémorragique extrêmement net, particulièrement saisissant et fréquent dans ce dernier organe. Le péritoine est très vascularisé, et un liquide, plus ou moins clair et en plus ou moins grande abondance, remplit la cavité péritonéale.

Inoculations intravésiculaires.

L'inoculation intravésiculaire de vibrions cholériques vivants et virulents ne provoque point la mort de l'animal. Les vibrions utilisés provenaient de culture sur gélose à 37 degrés et âgés de 18 à 24 heures. La quantité que nous inoculions était très variable : dans nos premières expériences, nous inoculâmes des doses extrêmement élevées, un tube de culture totale; les résultats furent, quelquefois, la mort de l'animal par septicémie en 36, 48 ou 52 heures; donc avec un retard très net sur les témoins. Plus tard, nous diminuâmes notablement la quantité de culture et nous remplaçâmes le milieu primitif neutre par du bouillon, ou mieux de l'eau peptonée. Finalement, nous ensemencions extempo-

(1) Culture provenant de l'Institut Pasteur, et portant la mention : Vibrion cholérique. Dnieper, due, ainsi que les autres, à l'obligeance de M. Legroux.

(2) Dans un certain nombre de cas, la mort survint quelques minutes après l'inoculation. Elle était due, selon toute probabilité, aux toxines contenues dans le liquide injecté et non au milieu de culture (gélose) inoffensif chez les animaux témoins.

ranément 1 centimètre cube d'eau peptonée avec une öse de culture cholérique de 24 heures à 37 degrés et nous inoculions le mélange, pour ainsi dire à « l'état naissant », dans la vésicule.

Les symptômes présentés chez les animaux inoculés intra-vésiculairement se réduisent à peu près à rien. On note, dans les 24 à 36 heures qui suivent l'opération, une très légère élévation de température et un peu d'abattement, mais le choc opératoire consécutif à une laparotomie peut suffisamment expliquer des phénomènes d'ailleurs légers et fugaces.

A l'autopsie, on ne constate aucune lésion organique; tous les organes sont normaux, comme aspect extérieur, coloration, poids, etc. La vésicule biliaire seule présente des modifications qui sont analogues à celles que nous avons décrites dans la première partie de cet ouvrage, et sur lesquelles nous ne reviendrons point.

Inoculations intravésiculaires suivies d'injections intraveineuses.

L'injection intraveineuse de culture de vibrions vivants et virulents chez un lapin vacciné intravésiculairement ne déchaîne aucun phénomène morbide, alors que les animaux témoins meurent en l'espace de quelques heures par intoxication cholérique.

Les expériences ayant conduit à cette formule, maintes fois répétées, ont toujours donné des résultats identiques, que nous pouvons résumer ici en prenant un type moyen.

Exemple : Lapin n° 79, inoculé dans la vésicule le 30 septembre avec 1/2 centimètre cube de bouillon ensemencé extemporanément avec une culture cholérique de 24 heures sur gélose à 37 degrés.

Le 3 novembre, c'est-à-dire un mois plus tard, inoculation intraveineuse de 1 tube de culture cholérique de 48 heures sur gélose à 37 degrés diluée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique.

L'animal témoin, lapin n° 56, meurt en hypothermie 6 heures après l'injection intraveineuse de vibrion cholérique, avec les signes d'intoxication cholérique suraiguë.

Le lapin n° 79, vacciné, ne présente aucune réaction de poids et de température, soit immédiatement, soit plusieurs heures ou plusieurs jours après l'injection intraveineuse.

On peut en déduire qu'il était suffisamment vacciné pour supporter sans réagir une dose mortelle de culture cholérique.

Les résultats n'ont pas toujours été aussi typiques. Il faut que l'animal soit suffisamment immunisé et la valeur de cette immunisation peut échapper, puisque aucun moyen de contrôle n'existe pour la mettre en évidence, si ce n'est précisément l'injection intraveineuse. Cependant l'agglutination paraît fournir quelques données précieuses ; et si, sur les 22 animaux mis en expérience, 2 inoculés intravésiculairement, puis secondairement dans les veines, sont morts, encore qu'avec un retard très prononcé sur les témoins l'agglutination aurait pu peut-être permettre de prévoir cet échec, puisque le taux agglutinatif du sérum ne s'était élevé un mois après l'inoculation intravésiculaire qu'à 1 p. 25.

Mais ce ne sont là que des exceptions et, d'une façon générale, tout animal suffisamment vacciné intravésiculairement, c'est-à-dire présentant un sérum capable d'agglutiner à 1 p. 100, pourra supporter, lorsque ce taux sera atteint, c'est-à-dire 8 à 12 jours après l'inoculation, une dose mortelle intraveineuse de vibrions.

Hyperimmunisation.

Si quelques jours après, au même animal, on refait une nouvelle injection intraveineuse avec la même dose de vibrion cholérique, on arrive à produire une hyperimmunisation très nette.

Exemple : Lapin n° 38, le 30 mai, inoculation intravésiculaire de bouillon ensemencé avec une culture cholérique ; il ne présente aucune réaction générale.

Le 3 juillet, il reçoit en injection intraveineuse un tube de culture de vibrion sur gélose à 37 degrés de 24 heures.

Le 6 juillet, nouvelle injection identique à la précédente; réaction fébrile pendant 24 heures.

L'animal à la suite de cette double injection est totalement immunisé. Le taux de l'agglutination de son sérum passe, en l'espace de quelques jours, de 1 p. 100 à 1 p. 30.000. Ce sérum

offre des propriétés immunisantes très prononcées, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

Propriétés du liquide vésiculaire.

Nous savons que la vésicule biliaire présente en son intérieur, bientôt après l'inoculation cholérique, un liquide blanc crémeux, plus ou moins épais suivant l'époque d'inoculation, et ne renfermant plus de vibrions après un temps relativement court. Les frottis sur lames, les ensemencements en eau peptonée et les inoculations demeurent toujours négatifs.

Toutefois, un point paraît intéressant : ce liquide, dépourvu alors de bactéries, lourdement chargé de globules blancs, dont quelques-uns sont en voie de dégénérescence, dont les autres sont encore en pleine activité (la proportion des uns aux autres variant en sens inverse au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la date d'inoculation), n'est pas un liquide indifférent, neutre.

Si l'on inocule à un cobaye (cobaye 53) dans la cavité péritonéale, tout le contenu, âgé de 1 mois, de la vésicule biliaire d'un lapin, dont le sérum agglutine à 1 p. 500, l'animal ne présente aucune réaction générale. Mais si, 6 jours après, l'on inocule dans cette même cavité péritonéale quelques centimètres cubes d'eau physiologique, contenant en suspension 1/2 tube de vibrion cholérique, âgé de 24 heures sur gélose à 37 degrés, l'animal ne présente, cette fois encore, aucune réaction.

Et cependant tout autre cobaye qui reçoit seulement cette demi-culture cholérique meurt certainement en l'espace de 18 à 24 heures. De même mourra tout cobaye dont l'inoculation vibrionienne, intrapéritonéale, sera précédée 6 jours auparavant de quelques gouttes d'un liquide favorisant l'hyperleucocytose, tel que 1 centimètre cube d'eau peptonée glucosée, comme on peut le constater par le tableau ci-après.

Le fait d'avoir fait précéder de 6 jours au moins l'injection vibrionienne par l'injection du liquide vésiculaire, doit faire écarter l'hypothèse d'une de ces hyperleucocytoses péritonéales si faciles à déterminer chez le cobaye, et également très rapide dans leur évolution, puisque, atteignant leur maximum vers

la vingtième heure, elles sont totalement évanouies vers le 3[e] jour.

INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES		
1[er] jour.	7[e] jour.	Résultats.
Liquide vésiculaire.	Vibrion cholérique (dose mortelle).	Vivant.
Eau peptonée glucosée.	Id.	Mort en 18 heures.
Pas d'injection.	Id.	Id.

Propriétés du sérum.

Le sérum, obtenu par les procédés cités dans les chapitres précédents, présente les propriétés que l'on rencontre dans tout sérum immunisant, préparé avec les corps bactériens et avec des toxines.

Il diffère donc des sérums anticholériques obtenus habituellement par ce fait qu'il est non seulement antibactérien, mais également antitoxique.

Avec ces deux propriétés fondamentales, se manifestent d'une part, les pouvoirs agglutinants, bactéricides et sensibilisateurs, d'autre part, le pouvoir précipitant que nous avons déterminés par les méthodes habituelles.

Pouvoir antibactérien. — (Bactério-agglutinines et sensibilisatrices ou philocytases, ou ambocepteurs ; et alexines, ou cytases, ou compléments, ou lysines.)

Le sérum protège le cobaye contre la péritonite cholérique (expérience positive de Koch). Si on injecte à un cobaye dans le péritoine 1/2 culture de vibrions cholériques sur gélose à 37 degrés de 18 heures et diluée dans 2 centimètres cubes d'eau physiologique, on sait que l'animal meurt en 18 à 24 heures en hypothermie, après avoir présenté du collapsus et des convulsions. A l'autopsie, on trouve un intestin congestionné, teinte hortensia, et du liquide péritonéal en plus ou moins grande abondance.

Expérience I. — Si l'on ajoute à une dilution semblable de vibrions 2 centimètres cubes de sérum, et que l'on mette ce

mélange à l'étuve à 37 degrés durant 1 heure, on peut l'inoculer dans la cavité péritonéale d'un cobaye, sans déterminer la mort, ou même sans provoquer de phénomènes réactionnels.

Expérience II. — Il en sera de même si le sérum a été injecté seul dans le péritoine 24 heures avant la culture. Les vibrions sont agglutinés, transformés en granules, dissous partiellement (phénomène de Pfeiffer). Ces résultats étaient à prévoir d'après les réactions *in vitro*. Mais, bien que celles-ci soient extrêmement nettes et généralement intenses, on ne peut nullement en déduire la valeur thérapeutique ou préventive d'un sérum, puisque « le sérum d'un animal fortement immunisé est toujours plus agglutinant *in vitro* qu'il n'est préventif vis-à-vis de la péritonite vibrionienne, plus antitoxique vis-à-vis de l'intoxication cholérique expérimentale qu'il n'est précipitant *in vitro*. Cela veut dire, en d'autres termes, que le pouvoir préventif n'est pas fonction exclusive du pouvoir agglutinant, comme le pouvoir antitoxique n'est pas fonction du pouvoir précipitant ». (Salimbeni.)

Expérience III. — Enfin, lorsque l'inoculation de sérum est faite préventivement sous la peau, les résultats sont encore positifs.

Exemple : Inoculation sous-cutanée à un cobaye, 48 heures avant l'injection intrapéritonéale vibrionienne, de 5 centimètres cubes de sérum agglutinant *in vitro* à 1 p. 2.000. L'animal résiste ; le témoin meurt.

Toutefois, l'on sait que rien n'est plus facile que de protéger le cobaye contre la péritonite cholérique. Il suffit de lui injecter dans la cavité péritonéale au préalable quelques gouttes de bouillon, d'eau peptonée, d'eau glucosée, ou simplement d'eau physiologique. On détermine ainsi une arrivée de leucocytes *in situ* capables d'enrayer l'évolution morbide. D'autre part, la réaction péritonéale n'est point proportionnelle à la virulence du vibrion. L'expérience II n'est donc pas probante. Au contraire, les expériences I et surtout III conservent toute leur valeur.

Une expérience beaucoup plus sévère consiste à faire les réactions sur des lapins en procédant par inoculation intraveineuse.

Si on injecte dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin

un mélange laissé préalablement 1 heure à l'étuve à 37 degrés et constitué par une culture de vibrions cholériques âgée de 18 heures sur gélose à 37 degrés, diluée dans 5 centimètres cubes d'eau physiologique et additionnée de 2 à 3 centimètres cubes de sérum immunisant, l'animal ne présente qu'une très faible réaction se traduisant par une légère hyperthermie durant quelques heures (1), et par un léger abattement. Puis il se remet complètement et définitivement.

Les témoins meurent dans l'espace de quelques heures en hypothermie, par suite d'intoxication et d'infection suraiguës.

Si, au lieu d'injecter d'emblée un mélange de sérum et de vibrions, on inocule, 24 heures avant l'injection intraveineuse de vibrions, le sérum en injection également intraveineuse, les résultats sont comparables : le témoin meurt ; l'animal immunisé survit, ayant peut-être présenté encore moins de phénomènes réactionnels que l'animal qui a reçu d'emblée le sérum et la culture mélangés.

Ces expériences permettent de dire que le sérum est nettement antibactérien, puisque, injecté préventivement, il est capable d'empêcher l'éclosion des phénomènes cholériformes provoqués par l'injection de cultures virulentes.

Ajoutons que l'animal qui a reçu le mélange : vibrion + sérum, sans offrir de réaction générale, n'est point capable par contre de fournir un sérum doué de propriétés bactéricides. Son sang ne présente aucun des caractères des sérums immunisants : dans notre expérience, 12 jours après l'inoculation du mélange précité, ce sang ne renfermait ni agglutinines, ni précipitines, ni sensibilisatrices, ni antitoxines. Inoculé à cette époque avec une culture pure, vibrionienne, identique à celle qu'il reçut la première fois, l'animal a conservé sa sensibilité antérieure vis-à-vis du choléra ; lui et le témoin se comportent de même, mourant tous deux en hypo-

(1) Lapin 31 :

Température avant l'injection	39°5
1 heure après l'injection	39°5
3 heures après l'injection	41°8
5 — après l'injection	41°
20 — après l'injection	39°7
30 — après l'injection	39°5
40 — après l'injection	39°5

thermie, d'intoxication chlolériforme avec lésions intestinales plus ou moins prononcées suivant la rapidité de l'évolution morbide.

Il en résulte que l'animal n'était pas immunisé, quoique ou plutôt précisément parce que le sérum ajouté aux vibrions ainsi sensibilisés était en trop grande quantité, et comme l'a dit Besredka (1) : « lorsqu'il se trouve en excès, les microbes injectés en même temps que lui traversent l'organisme sans que l'animal en garde le moindre souvenir ».

Autrement dit, dans ces conditions, la conservation de la sensibilité à l'intoxication cholériqne, la mort lors d'une seconde injection vibrionnienne, prouvent nettement que les principes toxiques et les vibrions contenus dans le mélange antérieur avaient été nettement détruits et neutralisés par ce sérum [expérience positive des réactions paradoxales de R. Pfeiffer et Friedberger] (2).

Pouvoir antitoxique. — Afin de déterminer le pouvoir antitoxique des sérums, nous avons eu recours à deux sortes d'expériences, en faisant agir le sérum sur :

1° La toxine préparée artificiellement;

2° La toxine fabriquée naturellement par l'organisme (choléra expérimental).

1° *a*) La méthode de Roux, Metchnikoff et Salimbeni pour la préparation de la toxine cholérique ne nous a fourni qu'un liquide très faiblement toxique; et cette toxicité très atténuée est peut-être due au pouvoir toxigène restreint du vibrion que nous avions.

b) La méthode de Brau et Denier que nous employâmes ensuite nous a donné des résultats à peu près analogues.

Nous n'obtînmes jamais une toxine normale, moyenne, équivalente à celle de Salimbeni, c'est-à-dire déterminant la mort du cobaye par la seule injection sous-cutanée de 1 centimètre cube. Nous dûmes avoir recours à des doses 10 ou 20 fois plus fortes pour obtenir la mort en 48 à 52 heures, et dans quelques cas les témoins survécurent.

Toutefois, dans leur ensemble, en opérant sur un nombre relativement élevé de cobayes (16), nous pûmes nous rendre

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 922.
(2) *Berliner klin. Wochenschrift*, 1902, n° 25.

compte que le mélange de sérum et de toxine était indifférent à l'animal, et que l'inoculation préventive de sérum empêchait tout développement de phénomènes morbides lors d'une injection de toxine faite 12 ou 24 heures après; les témoins, par contre, étaient sérieusement éprouvés, et un certain nombre mouraient.

c) L'autolysat de cultures cholériques d'après la méthode de Strong (1) nous a donné des résultats analogues, mais en employant également, vu le faible pouvoir toxigène de nos cultures, des doses beaucoup plus fortes que celles qui sont généralement usitées.

2° Nous essayâmes ensuite le sérum, non plus sur une toxine plus ou moins virulente et ne se rapprochant peut-être que vaguement des produits élaborés par le vibrion cholérique au niveau de l'intestin et lancés de là dans l'organisme, mais sur l'animal atteint de choléra, c'est-à-dire précisément sur cette toxine diffuse en tous points.

Pour provoquer le choléra expérimental, nous employâmes le procédé de Metchnikoff (2), qui consiste, comme l'on sait, à faire ingérer à de jeunes lapins à la mamelle, âgés de 2 à 6 jours, des cultures cholériques associées à des espèces microbiennes favorisantes et principalement une sarcine et une torula (ou cryptococcus) à raison de 1 tube de culture de 18 heures à 37 degrés sur gélose, de chacune de ces bactéries : choléra, sarcine et torula. La mort arrive entre 40 et 60 heures, généralement en hypothermie; à l'autopsie, on trouve des lésions typiques congestives de l'intestin avec teinte hortensia de l'intestin grêle, rempli d'un contenu diarrhéique et de grains riziformes blanc jaunâtre ou jaune d'or; de la distension de la cavité abdominale contenant un liquide louche, séreux, etc.

La difficulté de nous procurer de petits lapins a limité le nombre de nos expériences; nous avons fait 5 essais que voici, brièvement résumés :

Premier essai. — 11 mai. Sérum frais, agglutinant à 1 p. 1.000, provenant du lapin n° 8 inoculé intravésiculairement 1 mois auparavant; ce sérum est injecté sous la peau à

(1) Publications of the bureau of government. Lab. biolog. laborat., n° 16, 1904, Manille.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894.

raison de 2,5 centimètres cubes par animal, 48 heures avant l'ingestion du mélange choléra-sarcine-torula.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 52 heures.	
Ayant reçu le sérum	2 lapins.
Ayant reçu le choléra seul	2 —
N'ayant reçu ni choléra ni sérum	1 lapin.

Les 2 témoins (choléra seul) meurent, l'un 36, l'autre 48 heures après l'ingestion. Les 3 autres survécurent, indemnes.

Deuxième essai. — 8 novembre. Sérum frais agglutinant à 1 p. 2.500, provenant d'un lapin hyperimmunisé (inoculation intravésiculaire suivie de 2 injections intraveineuses). Ce sérum est inoculé à raison de 3,5 centimètres cubes sous la peau de chacun des animaux 48 heures avant l'ingestion du mélange (choléra-sarcine-torula).

Age des lapins au moment de l'ingestion : 36 heures.	
Ayant reçu le sérum	4 lapins.
Ayant reçu le choléra seul	2 lapins.
N'ayant reçu ni sérum ni choléra	1 lapin.

Les 2 témoins (choléra seul) meurent, l'un 24, l'autre 30 heures après l'ingestion, avec lésion cholérique typique. Un animal ayant reçu le sérum meurt 52 heures après l'ingestion cholérique. Les 4 autres survécurent, bien portants.

Troisième essai. — 12 novembre. Sérum frais, agglutinant à 1 p. 100 seulement, provenant d'un lapin immunisé intravésiculairement ; ce sérum est injecté sous la peau des lapins à raison de 2,5 centimètres cubes, 24 heures avant l'ingestion du mélange cholérique.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 70 heures.	
Ayant reçu le sérum	3 lapins.
Ayant reçu le choléra seul.	1 lapin.
N'ayant reçu ni sérum ni choléra	1 —

Les 4 premiers lapins meurent, le témoin en 24 heures et les autres en 36, 50 et 62 heures.

Quatrième essai. — 18 novembre. Sérum frais agglutinant à 1 p. 10.000 provenant d'un animal hyperimmunisé. Ce sérum est inoculé à raison de 4 centimètres cubes sous la peau, 12 heures avant l'ingestion du mélange.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 28 heures.	
Ayant reçu le sérum	2 lapins.
Ayant reçu le choléra seul	2 —

Les 2 témoins (choléra seul) meurent en 26, 30 heures.

Les 2 autres résistent, sans avoir présenté aucun symptôme morbide.

Cinquième essai. — 30 novembre. Sérum frais agglutinant identique à celui du quatrième essai. Ce sérum est inoculé à raison de 2 et 4 centimètres cubes sous la peau 2 heures et 12 heures avant l'ingestion du mélange.

Age des lapins au moment de l'ingestion : 32 heures

Ayant reçu 2 cent. cubes de sérum (2 heures avant) . .	2	lapins.
Ayant reçu 4 cent. cubes de sérum (12 heures avant). .	2	—
Ayant reçu le choléra seul	2	—

Les deux témoins meurent en 24 heures.

Des lapins ayant reçu le sérum 2 heures auparavant, l'un meurt, l'autre résiste. Les deux autres résistent également.

Nous ne devons point tenir compte du troisième essai. Un sérum agglutinant à 1 p. 100 seulement, n'ayant présenté aucune propriété antitoxique *in vitro*, ne devait point protéger contre l'intoxication cholérique expérimentale. Nous n'en fîmes l'essai que par la raison qu'au moment où nous eûmes à notre disposition ces jeunes lapins, nous n'avions pas d'autre sérum sous la main.

Il résulte donc, cet essai mis à part, que le sérum convenablement préparé est nettement antitoxique, non seulement *in vitro*, mais encore *in vivo*.

Le sérum obtenu par l'inoculation intravésiculaire de vibrions cholériques est donc doué de propriétés immunisantes. Il est antibactérien et antitoxique. Le fait est intéressant parce que tout sérum cholérique antitoxique est exclusivement obtenu au moyen d'inoculation de toxines cholériques (sérum de Metchnikoff, Roux et Salimbeni), préparées par injections de toxine cholérique dans les veines du cheval.

Le sérum de Pfeiffer, préparé avec des corps vibrioniens, a de très grandes propriétés bactéricides : il protège efficacement le cobaye contre la péritonite cholérique; par contre, il ne manifeste aucun pouvoir antitoxique : il ne paraît point pouvoir immuniser les jeunes lapins contre l'ingestion de vibrions.

Les expériences qui précèdent démontrent que l'on peut provoquer la formation d'antitoxines dans l'organisme d'un animal

qui ne reçoit en injections vaccinantes que des corps microbiens, résultat à rapprocher de celui que l'on obtient avec le sérum antipesteux, également antitoxique et pourtant exclusivement préparé avec des bacilles pesteux.

BACILLE TYPHIQUE

L'inoculation intravésiculaire de bacilles typhiques (1) provoque, chez l'animal auquel on a fait l'opération, la formation d'anticorps spécifiques.

Exemple : lapin n° 2, reçoit le 12 avril, dans la vésicule biliaire, 1 centimètre cube d'une culture de bacille d'Eberth en bouillon de 24 heures à 37 degrés.

Le 21 avril, c'est-à-dire 8 jours après l'inoculation, le sérum, qui avant l'opération ne présentait aucun pouvoir agglutinatif, agglutine à 1 p. 750, et le 29 avril à 1 p. 1.000.

Un lapin témoin, ayant reçu la même quantité de bacilles, mais en injection intrapéritonéale, présentait, 8 jours après, un taux agglutinatif n'atteignant point 1 p. 50.

L'animal, opéré intravésiculairement, ne montre à aucun moment des phénomènes réactionnels ; le poids, la température restent normaux.

4 mois après, le taux agglutinatif s'était maintenu à 1 p. 1.000 ; aucune des propriétés immunisantes n'avait disparu.

A cette époque, l'animal, bien portant, ayant augmenté de 400 grammes, est sacrifié. On ne trouve aucune lésion organique ; le foie, la rate, les reins, les poumons, le péritoine sont normaux. Mais la vue est attirée par la vésicule biliaire, formant une tumeur énorme, blanche, contrastant sur le fond rouge hépatique. Elle est de la grosseur d'un œuf de poule, à parois dures, blanches, fibreuses, épaissies. A l'intérieur de cette tumeur, on trouve le liquide habituel, décrit précédemment, mais en proportion inaccoutumée (40 cent. cubes) ; les ensemencements restent stériles.

Le sérum de ce lapin n° 2 a été essayé sur de jeunes lapins âgés de 1 mois et inoculés intrapéritonéalement avec des cultures typhiques, à raison de 3 et 4 centimètres cubes de culture en bouillon de 48 heures à 37 degrés. Le sérum avait été

(1) Culture provenant de l'Institut Pasteur.

inoculé l'avant-veille sous la peau à raison de 4 centimètres cubes, et dans la cavité intrapéritonéale à raison de 2 centimètres cubes.

Dans les 8 expériences faites, les 2 témoins moururent, 18 à 25 jours après, de cachexie, due sans doute à l'élaboration de toxines typhiques, tandis que les animaux, traités préventivement avec le sérum, survécurent.

Les bacilles que nous employâmes, malgré les tentatives d'exaltation de virulence par les passages en séries chez le cobaye et par des cultures en sacs (Chantemesse et Widal),

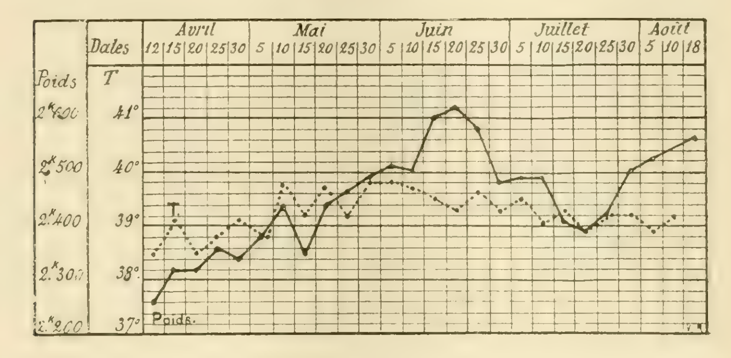


Fig. 6.

(Chantemesse et Balthazard), n'atteignirent jamais, quoique possédant des propriétés toxiques certaines, une virulence très grande ; ceci explique la mort lente des témoins.

Le même sérum, essayé comme agent neutralisateur de la toxine typhique, a donné des résultats analogues.

La toxine, préparée suivant la méthode de Conradi, tuait les témoins en injection intrapéritonéale, et préservait les animaux qui, dans la cavité péritonéale, avaient reçu 48 heures auparavant le sérum immunisant, ou recevaient extemporanément un mélange de sérum et de toxine laissé préalablement 2 heures à 37 degrés. Les animaux témoins moururent presque tous (4 sur 5) lentement, quoique la toxine fût injectée en quantité très grande : 5 centimètres cubes pour de jeunes lapins de 650 à 700 grammes ; on dépassait ainsi de beaucoup les doses mortelles employées par Conradi (0,2 cent. cube) en injection intrapéritonéale chez le cobaye.

Avant de terminer ce chapitre, rapportons un fait qui peut être rapproché de ceux que nous avons relatés précédemment, dans la première partie.

Le lapin n° 1, inoculé intravésiculairement le 12 avril, fournissait, 8 jours après l'opération, un sérum agglutinant à 1 p. 750. Les 15e, 20e et 30e jour, le taux agglutinatif était resté identique.

Le 1er juillet, c'est-à-dire après 2 mois et demi, le taux agglutinatif était redescendu à 1 p. 5, chiffre initial.

Le sérum du lapin n° 2 inoculé le même jour que le lapin n° 1 présente, un mois après l'opération, un pouvoir agglutinant égal à 1 p. 1.000, taux qu'il maintenait encore le 1er juillet.

A l'autopsie, le lapin n° 1 ayant été sacrifié, on remarque que tous les organes sont sains, mais que la vésicule biliaire n'offre pas les dimensions qu'on s'attendait à lui trouver ; petite et recroquevillée, elle présente sur une de ses faces un pertuis, signe d'une rupture antérieure.

De ce fait, il semble résulter que les anticorps ne se fabriquent et ne restent en circulation dans l'organisme qu'autant que la vésicule qui les engendre subsiste indemne. Si, pour une cause quelconque, la vésicule se rompt, les antigènes se répandent dans la cavité péritonéale ; là, surtout lorsque l'inoculation a eu lieu très longtemps avant, et qu'ils sont ou atténués ou en faible porportion, ils ne causent qu'une réaction infime et ils disparaissent résorbés ou éliminés. De nouveaux anticorps ne peuvent se former, et quant à ceux qui sont répandus dans l'organisme, ils ne tardent pas à disparaître également.

TUBERCULOSE AVIAIRE

Nous suivrons dans ce chapitre le même ordre que dans celui du choléra, étudiant d'abord les réactions consécutives aux *Injections intraveineuses*, puis aux *Inoculations intravésiculaires*, et aux *Inoculations intravésiculaires suivies d'injections intraveineuses*. Nous terminerons par la description des *Propriétés du sérum*.

Dans tous les cas qui vont être cités, les cultures employées furent toujours celles de bacilles de tuberculose aviaire (1)

(1) Ces cultures tuaient le cobaye en inoculation sous-cutanée, avec présence de bacilles dans les organes.

provenant de l'Institut Pasteur, et cultivées à 37 degrés.

Dans les premiers essais que nous fîmes, nous utilisâmes le bacille bovin, mais les réactions étant ou trop faibles ou inconstantes, et n'amenant pas, dans un laps de temps déterminé et relativement court, la mort chez les témoins, nous y renonçâmes.

Nous avons d'abord utilisé, tantôt des cultures sur pommes de terre glycérinées à 5 p. 100, tantôt des cultures sur milieu de Lumière (foie de bœuf glycériné à 6 p. 100); plus tard, nous avons employé des cultures sur gélose glycérinée à 5 p. 100.

D'ailleurs, la nature du milieu de culture sera indiquée à chaque observation.

Injections intraveineuses.

Les animaux témoins au nombre de 11, inoculés en injection intraveineuse, sont tous morts dans une période comprise entre le 11e et le 22e jour.

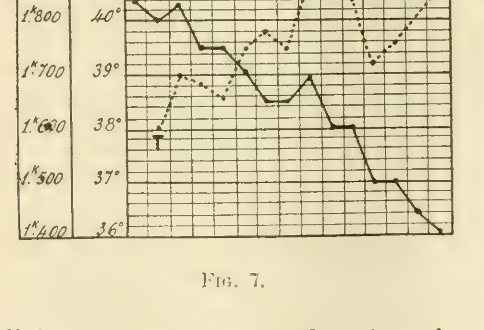


Fig. 7.

Les injections furent faites avec des cultures de tuberculose aviaire; une ou deux spatules de culture fraîche âgée de 1 à 2 mois et diluée dans 2 à 10 centimètres cubes d'eau physiologique.

Les symptômes constatés étaient généralement de l'amaigrissement, de l'anorexie, de l'abattement et une élévation de température, surtout les derniers jours (voir figure 7). A l'autopsie, les organes sont normaux comme forme, couleur et poids. On note seulement une hypertrophie légère du foie et de la rate. Le critérium de la cause de la mort se trouve dans les frottis de rate et de foie toujours criblés de bacilles très nets, quelle que soit la coloration employée. C'est le type classique décrit par Yersin. Ajoutons, toutefois, que nous n'avons jamais

rencontré l'hypertrophie « considérable de la rate et du foie » signalée dans ce cas.

Voici, d'ailleurs, le poids moyen des organes des témoins morts suivant le type Yersin, 11 à 22 jours après l'inoculation.

Foie.	65 gr. »	Bacilles très nombreux.
Rate.	1 gr. 5	Bacilles nombreux.
Reins	8 gr. (chaque).	Pas de bacilles.
Poumons	11 gr. (les deux).	Pas de bacilles.

Jamais nous n'avons constaté la forme granulique à l'autopsie des animaux.

Inoculations intravésiculaires.

Lapin n° 18, reçoit, le 13 mai, une inoculation de bacille tuberculeux aviaire dans la vésicule biliaire. La vésicule a été

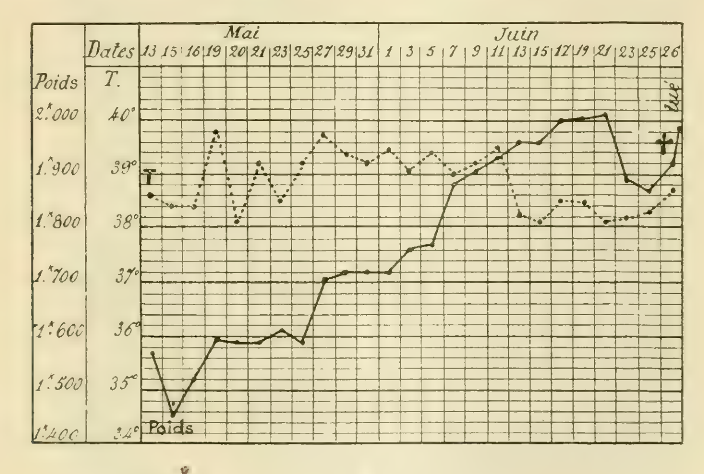


Fig. 8.

préalablement vidée de son contenu. La quantité de bacilles inoculés est de deux öses environ, diluées dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. Les bacilles proviennent d'une culture sur pomme de terre glycérinée à 37 degrés, âgée de 1 mois.

Poids de l'animal avant l'opération : 1.570.

Le 26 juin, c'est-à-dire 42 jours après, alors qu'il était en parfait état, l'animal est sacrifié (voir figure 8).

Son poids avait atteint 2 kilogrammes. Aucune modification extérieure; l'aspect de tous les organes: poumons, cœur, foie, rate, reins, intestins et séreuses, est normal.

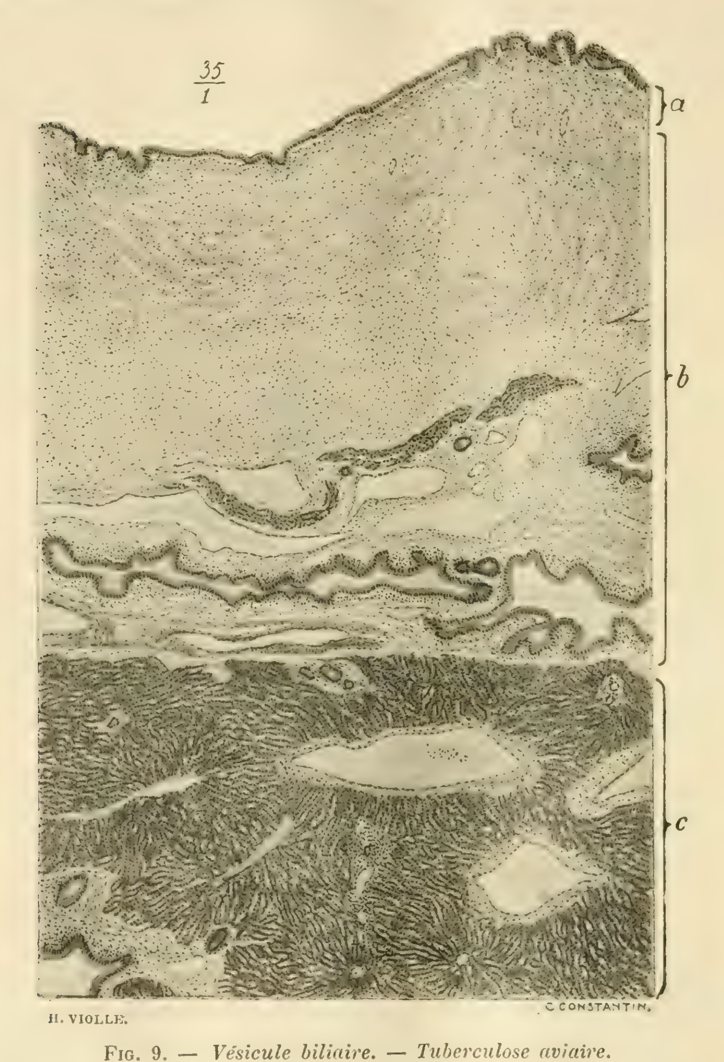


Fig. 9. — *Vésicule biliaire. — Tuberculose aviaire.*

a, muqueuse. — *b*, couche conjonctivo-fibreuse (très fortement épaissie et vascularisée). — *c*, tissu hépatique.

Voici d'ailleurs les poids moyens trouvés dans les autopsies faites chez différents animaux, dans les mêmes conditions :

Foie	50 à 70 grammes.
Rate.	0 gr. 75 à 2 grammes.
Reins	6 à 8 gr. (un seul.)
Poumons	10 à 15 gr. (les deux.)

La vésicule biliaire seule est modifiée (voir figure 9) et présente les lésions décrites dans la première partie de cet ouvrage.

L'inoculation du liquide vésiculaire, sous le pli de l'aine d'un cobaye, ne donne, après 2 mois, aucun résultat, l'animal n'ayant pas présenté de réaction locale ni ganglionnaire. A l'autopsie, aucune lésion organique, ni macroscopique ni microscopique.

Des frottis des différents organes du lapin inoculé : foie, rate, reins, poumons, moelle osseuse, ne montrent pas de bacilles tuberculeux.

Des inoculations de fragments de ces différents organes chez les cobayes restent négatives.

Des coupes histologiques de ces mêmes organes ne révèlent pas la présence du bacille tuberculeux.

En résumé, le lapin inoculé dans la vésicule biliaire, un mois et demi auparavant, avec des bacilles tuberculeux à dose mortelle, a résisté. La réaction a eu lieu seulement localement. Au niveau de la région inoculée, elle s'est manifestée par un apport assez considérable de leucocytes. L'infection ne s'est généralisée à aucun moment; l'organisme ne présente aucune trace de lésions anciennes ou récentes et une absence totale de ganglions suspects.

Tous les cas d'animaux inoculés peuvent être considérés comme calqués sur le précédent.

Les lapins témoins de même poids, inoculés en injection intraveineuse, avec une quantité équivalente de bacilles tuberculeux, sont tous morts rapidement (voir chapitre précédent).

Inoculation intravésiculaire suivie d'injection intraveineuse.

Inoculation le 13 mai au lapin 36 dans la vésicule biliaire, préalablement vidée, de 2 öses environ de bacilles tuberculeux aviaires dilués dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. La culture est âgée de 1 mois sur pomme de terre glycérinée à 37°.

Le 17 juillet, c'est-à-dire 2 mois environ après l'inoculation, le lapin 36 et le lapin 26 (témoin) reçoivent chacun une

injection intraveineuse de bacille tuberculeux (1/3 tube de culture diluée dans 2 centimètres cube d'eau physiologique; culture aviaire sur pomme de terre glycérinée de 2 mois à 37 degrés).

Le 31 juillet, c'est-à-dire 13 jours après l'inoculation, le lapin 26 meurt. A l'autopsie, lésions type Yersin.

Le 19 octobre, plus de 5 mois après la première inoculation intravésiculaire, bacillaire, et plus de 3 mois après l'injection intraveineuse également bacillaire, l'animal n° 36, en excellent

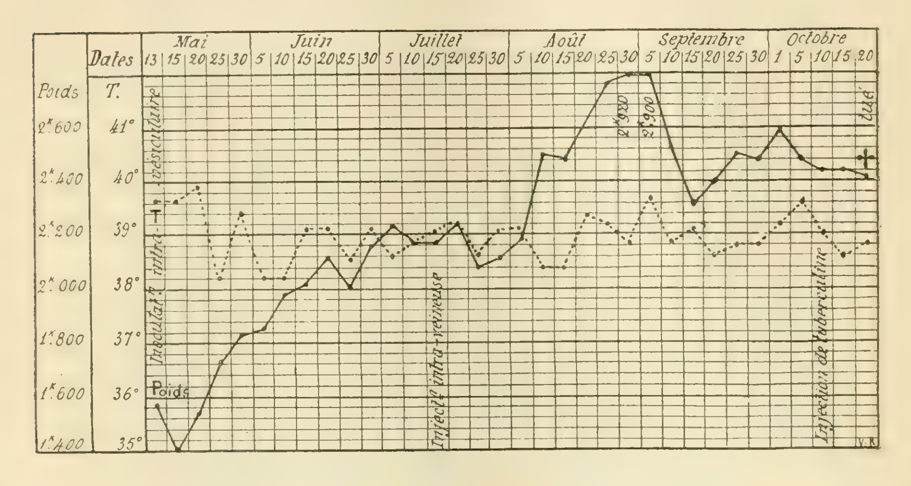


Fig. 10.

état, est sacrifié. A l'autopsie, aucune lésion macroscopique ni microscopique. Frottis des organes, ainsi qu'inoculations, négatifs.

La vésicule biliaire, de grosse dimension (17 gr. 50), présente les lésions déjà décrites précédemment.

Le liquide, environ 5 centimètres cubes (polynucléaires, la plupart dégénérés; et bacilles tuberculeux en assez grande abondance, prenant mal les colorants), est délayé dans une quantité égale d'eau physiologique et inoculé à un lapin (n° 84) en injection intraveineuse : 1 mois après l'inoculation, l'animal n'avait encore présenté aucune réaction; son poids avait sensiblement augmenté (voir fig. 11). Le 22 novembre, il reçoit avec un témoin une injection intraveineuse tuberculeuse. Le 10 décembre, le témoin meurt avec lésions tuberculeuses; l'autre animal, tué, ne présente aucune lésion spécifique.

Le lapin précédent, n° 36, présenta à l'autopsie 3 ganglions; l'un adossé à la colonne vertébrale, derrière le foie; l'autre, trachéo-bronchique, le troisième dans le bassin, adossé à une des veines iliaques; tous trois étaient de la grosseur d'un grain de blé, blancs, durs à la coupe, se composant d'une coque fibreuse et d'un contenu caséeux. Sur frottis, on ne constate pas la présence de bacilles, mais de quelques cellules géantes.

Inoculés après broyage et dilution en eau physiologique dans le pli de l'aine d'un cobaye, les ganglions ne donnent lieu à aucun retentissement ganglionnaire après plus de 2 mois. En coupe histologique, ces ganglions montrent des lésions de

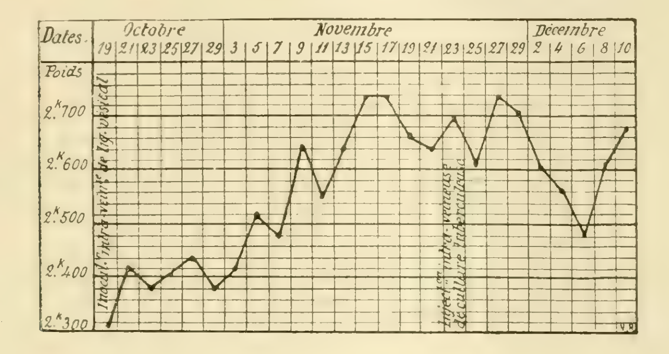


Fig. 11.

congestion et quelques lésions paraissant spécifiques, mais sans bacilles tuberculeux.

Le cas décrit plus haut est le cas courant, rencontré lors d'une autopsie variant entre 1 et 3 mois, après l'inoculation intraveineuse, consécutive elle-même à l'inoculation intravésiculaire. Il est évident que si l'autopsie a lieu dans un espace de temps beaucoup plus proche de l'inoculation intraveineuse, les faits ne seront pas absolument identiques. Le bacille qui vient d'être injecté en très grande quantité dans la circulation générale persistera dans l'organisme un certain temps. Ce temps est relativement très court, et c'est là le fait essentiel. Le bacille en premier lieu ne se développe pas, il ne peut se développer dans un sérum ou dans des organes baignés par un sérum qui jouit de propriétés bactéricides ou favorisant la bactériolyse. L'expérience suivante paraît en fournir la preuve.

Lapin n° 42, inoculé le 26 juin, intravésiculairement, avec une dose de culture aviaire sur gélose glycérinée à 37 degrés de 50 jours.

Le 22 août, c'est-à-dire 56 jours après l'inoculation, l'animal en pleine santé reçoit une injection intraveineuse tuberculeuse (1/2 culture sur gélose glycérinée à 37 degrés de 2 mois 1/2). Le surlendemain, l'animal est sacrifié. A l'autopsie : organes normaux, pas de lésions congestives, pas de liquide dans les séreuses, pas de ganglions. La vésicule présente les lésions habituelles, macroscopiques et microscopiques ; absence de bacilles dans tous les organes, sauf la rate, qui en contient une très faible quantité, et les reins où il y en a moins encore.

D'après ces faits, les bacilles paraîtraient soit éliminés au dehors (par les reins ou l'intestin), soit détruits *in vivo* (rate et organes lymphoïdes).

La présence de très rares bacilles au niveau de l'épithélium rénal semblerait permettre de croire à leur élimination par cette voie. Cependant, les inoculations, chez les cobayes, du culot de centrifugation de 5 centimètres cubes d'urine recueillie aseptiquement 24 heures après l'injection bacillaire intraveineuse, sont demeurées négatives après plus de 3 mois.

Quant à la voie intestinale, la méthode employée par Calmette avec succès chez le bœuf nous a donné sur 6 cobayes, après plus de 3 mois, 6 cas négatifs (inoculation de 1 gramme de matières fécales recueillies 24 heures après l'injection bacillaire intraveineuse).

Afin d'essayer de déterminer la durée de persistance des bacilles injectés dans les veines après l'inoculation vaccinante intravésiculaire, nous avons fait la recherche de bacilles tuberculeux dans le sang par le double procédé employé chez l'homme par Nattan-Larrier et Loeper-Louste. On agissait sur 10 centimètres cubes de sang pris par ponction intracardiaque et hémolysés immédiatement, soit par l'eau distillée dans la proportion de 10 centimètres cubes de sang pour 120 centimètres cubes d'eau (Nattan-Larrier), soit par l'alcool au tiers dans la proportion de 10 centimètres cubes de sang pour 20 centimètres cubes d'alcool (Loeper-Louste) ; puis on laissait reposer et on centrifugeait. Le culot de centrifugation, étalé sur lames et coloré, ne nous a jamais permis de découvrir le bacille dans

le sang, pris 24, 48 et 52 heures après l'inoculation intraveineuse. D'autres culots délayés dans un peu d'eau physiologique, puis inoculés aux cobayes (expériences sur 8 animaux), n'ont donné également aucun résultat positif.

La tuberculose chez le lapin n° 36, vacciné intravésiculairement, puis inoculé dans les veines, s'est signalée à l'autopsie par un nombre très élevé de bacilles dans la vésicule, et par l'apparition de ganglions dans l'organisme.

La présence de bacilles dans la vésicule est normale, puisque l'animal avait été inoculé en ce point. Mais ces bacilles injectés 5 mois auparavant, partiellement dégénérés, ne déterminent chez le cobaye et le lapin aucune lésion, et cela établit que les bacilles sont morts ou que, vivants, ils sont avirulents.

La présence de lésions ganglionnaires dans l'organisme en des points différents prouve qu'il y a eu lutte contre l'envahissement par le bacille tuberculeux; mais à quel moment?

Après l'inoculation intravésiculaire? Assurément non, puisque tous les animaux inoculés exclusivement dans la vésicule biliaire n'ont jamais présenté d'adénite consécutive.

Après l'injection intraveineuse? Mais toute injection intraveineuse de bacilles virulents cause la mort de l'animal en l'espace de 15 à 20 jours, suivant le type Yersin, c'est-à-dire sans provoquer aucune réaction ganglionnaire.

Quoi qu'il en soit, la présence de ganglions indiquant une réaction de défense, on doit en conclure que l'animal était immunisé; et, comme les ganglions sont peu nombreux et de petite dimension, et ne présentent ni périadénite, ni suppuration, l'immunité était très active. En fait, 2 mois après l'inoculation intraveineuse des bacilles tuberculeux, aucun vestige bacillaire ne persiste dans l'organisme. Et cependant ces bacilles étaient doués d'une grande virulence puisque les témoins mouraient en l'espace de 2 semaines, alors même qu'ils étaient inoculés avec des quantités très faibles.

Ainsi, un lapin vacciné par inoculation préalable de bacilles virulents dans la vésicule biliaire est capable de résister à l'inoculation intraveineuse d'une culture tuberculeuse virulente, inoculation toujours rapidement mortelle chez les témoins.

Un lapin rendu tuberculeux par inoculation sous-cutanée et mieux intrapéritonéale ou intraveineuse réagit quelquefois

fortement, généralement avec intensité, mais presque toujours nettement à une seconde injection tuberculeuse (phénomène de Koch) en présentant des phénomènes locaux ou généraux, ou les deux associés (1).

L'absence totale de réaction, même légère, même fugace, chez un lapin inoculé préalablement dans la vésicule et secondairement dans les veines avec une culture tuberculeuse, tendrait donc à prouver que l'animal est « vacciné » dans le sens où l'on emploie couramment ce terme, c'est-à-dire incapable de succomber à une nouvelle atteinte du bacille; qu'il est physiologiquement ou humoralement vacciné, c'est-à-dire que dans son organisme ne circulerait plus de tuberculine capable par l'addition d'une nouvelle dose de tuberculine (culture de bacilles ou toxines) de produire des phénomènes de superintoxication ou d'anaphylaxie.

On pourrait cependant admettre au contraire que l'animal ainsi vacciné aurait produit d'une façon lente et continue, sous l'influence de la dose initiale de bacilles tuberculeux inoculés intravésiculairement, de l'antituberculine, dont la présence ne se manifesterait par aucune action générale consécutive.

Propriétés du sérum.

Les lapins inoculés dans la vésicule biliaire avec une culture tuberculeuse aviaire, suivant la méthode indiquée précédemment, fournissent un sérum dont on a essayé de déterminer le pouvoir immunisant, soit chez les cobayes, soit chez les lapins.

Voici quelques exemples tirés des expériences faites :

Premier cas : 28 juin, injection sous-cutanée de 2 centimètres cubes de sérum (d'un lapin inoculé intravésiculairement 2 mois auparavant avec une culture tuberculeuse) aux 2 cobayes 28 et 29.

29 juin, 2e injection identique à la précédente.

Ce même jour, les 2 cobayes 28 et 29 et 2 autres cobayes 30 et 31 (témoins) reçoivent, sous la peau, au niveau de la face

(1) L'épreuve de la tuberculine-réaction, faite chez des lapins ayant reçu des bacilles tuberculeux, les uns en inoculations intravésiculaires, les autres en inoculations intraveineuses, d'autres en les deux voies, n'a pas fourni de résultats caractéristiques. On sait que les lapins réagissent mal, ou plus exactement, très inégalement, à la tuberculine (Arloing, Rodet et Courmont).

interne de la cuisse, 1 öse de bacilles tuberculeux aviaires (cultivés sur milieu de Lumière de 20 jours, à 37 degrés).

Le 30 juin, 3e injection de 2 centimètres cubes de sérum aux 2 cobayes 28 et 29.

Le 1er juillet, 4e injection de 3 cent. cubes de sérum aux mêmes animaux.

Le 3 juillet, 5e injection de 3 cent. cubes de sérum aux mêmes animaux.

Le 8 juillet, on constate l'apparition chez tous les cobayes de petits ganglions roulant sous le doigt, ayant la grosseur d'un pois et indolores.

Dans le courant du mois de juillet, chez les cobayes témoins 30 et 31, ces ganglions augmentent progressivement du côté du point d'inoculation, d'autres apparaissent de l'autre côté. Les ganglions restent petits, unilatéraux et insignifiants chez le cobaye 28. Le cobaye 29 a succombé peu après l'inoculation, probablement de septicémie ou d'anaphylaxie.

Le cobaye 31 meurt le 31 juillet, et son autopsie décèle des lésions typiques de tuberculose : la rate principalement contient des bacilles.

Le cobaye 30 meurt le 1er août, avec également quelques lésions tuberculeuses.

Quant au cobaye 29, il était encore vivant 6 mois après l'inoculation, ne présentant aucune lésion apparente ; son poids avait passé de 130 à 260 grammes.

Deuxième cas : Cobaye 75 reçoit en injection sous-cutanée 4 centimètres cubes d'un mélange de culture tuberculeuse et de sérum, resté 1 heure à l'étuve à 37 degrés et présentant après ce temps une forte agglutination. Le sérum provient d'un lapin inoculé 1 mois 1/2 auparavant dans la vésicule biliaire avec une émulsion de bacilles tuberculeux virulents.

Cobaye 76 reçoit préventivement en injection sous-cutanée 6 centimètres cubes de sérum, puis 24 heures après, une inoculation de bacilles tuberculeux.

Cobaye 77 reçoit, en injection sous-cutanée, une culture tuberculeuse seule (animal témoin).

Chez les 3 cobayes, les cultures tuberculeuses inoculées étaient équivalentes en quantité : 1 öse de bacilles tuberculeux de quinze jours sur gélose glycérinée à 37 degrés.

Le témoin 77 meurt 34 jours après l'inoculation, avec des lésions tuberculeuses (rate, foie contenant des bacilles tuberculeux), après avoir présenté un amaigrissement notable.

Le cobaye 75 est tué à même date. Poids légèrement diminué. A l'autopsie, ganglions de la grosseur d'une noisette au niveau du point d'inoculation avec contenu caséeux et bacilles, mais sans suppuration. Le foie, la rate et le pancréas contiennent quelques bacilles tuberculeux.

Le cobaye 76, tué également le même jour, a augmenté de poids. Il présente un ganglion à contenu caséeux avec zone périphérique sclérosée, au point d'inoculation. Très peu de bacilles dans ce pus. Les organes sont normaux : le foie et la rate ne contiennent aucun bacille; absence de bacilles également dans les autres organes.

Troisième cas : Cobaye 23. Reçoit en injection sous-cutanée 2 centimètres cubes de sérum provenant d'un lapin inoculé dans la vésicule biliaire 1 mois auparavant avec culture tuberculeuse virulente, puis 2 heures après cette première injection un mélange de 4 centimètres cubes du même sérum et 2 spatules (environ 6 öses) de bacilles tuberculeux (culture de 23 jours sur pomme de terre glycérinée à 37 degrés).

Cobaye 24, témoin, reçoit une culture tuberculeuse seule, en quantité équivalente à celle qui a été inoculée au cobaye précédent.

31 jours après l'inoculation, le témoin meurt, amaigri, avec lésions tuberculeuses généralisées (rate et foie contenant des bacilles tuberculeux).

Le cobaye 23, alors bien portant, et ayant augmenté de poids, est tué le même jour. Ganglions de la grosseur d'une noisette au niveau du point d'inoculation, avec zone fibreuse périphérique. Le contenu caséeux renferme des bacilles en assez grande proportion. Aucune généralisation : tous les organes sont sains; le foie et la rate ne renferment aucun bacille.

De tous ces faits, il résulte que les injections sous-cutanées de cultures vivantes et virulentes de tuberculose aviaire, à dose très élevée, ont tué, en provoquant des lésions de tuberculose généralisée, les témoins en 30 à 35 jours. Par contre, les animaux qui ont reçu préventivement, en injection sous-cutanée, du sérum d'animaux vaccinés intravésiculairement, à la dose de 10 centimètres cubes, résistent, ne présentant

qu'une lésion locale, au niveau du point d'inoculation, et aucune généralisation du bacille après plus d'un mois. Les doses moins élevées, injectées préventivement ou mélangées à la culture tuberculeuse, semblent insuffisantes.

Le mélange de culture tuberculeuse et de sérum en quantité suffisante, provenant d'un animal vacciné, paraît avoir perdu sa virulence. Les résultats furent toujours identiques, quoique les expériences tendant à établir ce fait fussent par 5 fois répétées. Elles peuvent être, dans leur ensemble, résumées ainsi :

Lapin A, reçoit un mélange de 5 centimètres cubes de sérum d'un lapin inoculé intravésiculairement 1 à 3 mois auparavant, et d'une culture tuberculeuse (1/8 tube de culture de tuberculose aviaire sur gélose glycérinée de 1 à 2 mois à 37 degrés, diluée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique). Le mélange bien agité a été laissé en contact 2 heures à 37 degrés. On inocule les 10 centimètres cubes dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin neuf.

Lapin B, sert d'animal témoin; il reçoit, en injection intraveineuse également, la même quantité de bacilles tuberculeux, dilués dans la même quantité d'eau physiologique.

Après une période de 12 à 15 jours, l'animal témoin B meurt de tuberculose à type Yersin.

L'animal A, ayant reçu le mélange, résiste et ne présente à aucun moment une réaction quelconque, pouvant se traduire par une diminution de poids ou une élévation de température. Sacrifié 2 mois après l'inoculation intraveineuse, l'animal, en parfait état, ne montre aucune lésion tuberculeuse.

Il s'ensuit donc qu'une culture tuberculeuse, additionnée de sérum selon le mode indiqué, paraît totalement avirulente alors que la même culture, injectée seule, cause la mort de l'animal témoin très rapidement.

Le mélange préparé comme nous l'avons dit ci-dessus, et laissé 2 heures à l'étuve à 37 degrés, n'est plus, à l'inverse du tube témoin qui ne renferme qu'une émulsion de bacille tuberculeux, une solution trouble et laiteuse. Le liquide s'est séparé en deux couches absolument nettes et distinctes : l'une inférieure, pâteuse, floconneuse, blanche, dense, composée exclusivement de bacilles; l'autre supérieure, claire, ambrée, qui n'est autre que le sérum surnageant. Il y a donc eu agglutination totale

ou précipitation en 2 heures de tous les éléments bacillaires sous l'influence du sérum. Cela peut permettre, *a priori*, d'interpréter les différences essentielles de réactions que l'on constatera chez les animaux injectés ou témoins.

CONCLUSIONS

L'inoculation de divers antigènes dans la vésicule biliaire du lapin, au préalable transformée en sac vide et clos, provoque chez l'animal opéré la formation d'anticorps correspondants spécifiques.

Ce mode d'inoculation est aisé à pratiquer. Il ne fait jamais éprouver à l'animal de violentes réactions.

Bien conduite, l'immunisation se fait rapidement dans la plupart des cas. Elle ne présente pas de phases négatives; sa durée semble fort longue.

Dans le cas où cette immunisation paraîtrait trop légère, des injections intraveineuses consécutives du même antigène permettent de mettre, sans réaction, l'animal en état d'hyperimmunisation.

Les bactéries employées comme antigènes engendrent des anticorps immunisants (immunisation active) et le sérum des animaux vaccinés est généralement doué de propriétés immunisantes, bactériennes et antitoxiques (immunisation passive).

Les anticorps paraissent essentiellement formés aux dépens des leucocytes qui, attirés par l'antigène, pénètrent dans la vésicule, grâce aux connections vasculaires hépato-vésiculaires.

Le foie agirait comme réservoir de sang et par suite de globules blancs.

EXPLICATION DES PLANCHES XII ET XIII

Pl. XII. *Figure* 1. — Muqueuse de la vésicule biliaire. Choléra; *a*, polynucléaire; *b*, figure de mitose; *c*, cellule de la muqueuse; *d*, polynucléaire; *e*, tissu conjonctif.

Figure 2. — Tissu hépatique contigu à la vésicule biliaire. *a*, cellule hépatique; *b*, polynucléaire; *c*, figure de caryocinèse.

Pl. XIII. *Figure* 1. — Vésicule biliaire et son contenu. Choléra. *a*, polynucléaires; *b*, chorion; *c*, endothélium; *d*, tissu conjonctif.

Figure 2. — Vésicule biliaire et son contenu. Tuberculose aviaire. *a*, bacille tuberculeux aviaire; *b*, globules blancs dégénérés; *c*, polynucléaire; *d*, cellules endothéliales; *e*, mononucléaires; *f*, tissu conjonctif.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE JUILLET 1912 N° 7

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ENQUÊTE SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA TUBERCULOSE DANS LES COLONIES FRANÇAISES

par A. CALMETTE.

(Institut Pasteur de Lille).

On sait depuis longtemps que la tuberculose est très inégalement répandue dans les diverses régions du globe et qu'elle est surtout fréquente chez les peuples civilisés. Sa diffusion est en rapports étroits avec l'intensité des échanges commerciaux et il semble bien que les Européens, qui sont de beaucoup le plus atteints, constituent les principaux véhicules de l'infection bacillaire à travers le monde.

Il serait extrêmement profitable à nos connaissances sur l'étiologie de cette maladie, si meurtrière, de pouvoir observer la manière dont elle se répand et les formes qu'elle affecte dans un pays jusqu'alors indemne. On pourrait sans doute en déduire les conditions d'une prophylaxie plus efficace que celle que nous avons essayé d'organiser jusqu'à présent. C'est ainsi que nous sommes actuellement portés à ne considérer comme contagieux que les sujets dont les lésions tuberculeuses sont ouvertes, principalement les phtisiques qui disséminent autour d'eux une très grande quantité de bacilles avec leurs crachats. Or, les faits expérimentaux que j'ai récemment publiés avec mon collaborateur *C. Guérin* (1) montrent que les animaux (bovidés)

(1) Ces *Annales*, 25 septembre 1911, p. 625.

auxquels on a conféré, par les méthodes de vaccination actuellement connues, une résistance plus ou moins grande à l'égard de l'infection tuberculeuse, ou que ceux qui sont rendus naturellement résistants par une infection bénigne, restée latente ou occulte, possèdent la faculté d'éliminer en nature, avec leurs excréments, par les émonctoires normaux de l'organisme (foie et intestin), un grand nombre de bacilles virulents pour d'autres animaux mais qui ne provoquent, chez ceux qui les émettent, aucune lésion tuberculeuse. Il est à supposer que ce phénomène n'est pas spécial aux bovidés et que beaucoup d'hommes, auxquels une infection bénigne antérieure ou restée latente a conféré une immunité relative, sont susceptibles, tout en restant eux-mêmes en apparence parfaitement indemnes, de semer dans leur entourage des germes virulents. S'il en est ainsi, on comprend que la tuberculose puisse être propagée très aisément par des voyageurs européens, qu'aucun signe objectif ne permet de considérer comme des malades, parmi les populations qui avaient été précédemment le mieux épargnées à cause de leur isolement dans des régions encore inexplorées du globe.

Les procédés de diagnostic dont nous disposons aujourd'hui — principalement la cuti-réaction tuberculinique de *Von Pirquet* — nous permettent de déceler avec une grande précision l'existence de ces infections latentes ou occultes qui sont apparemment les sources les plus dangereuses, parce qu'insoupçonnées, de contagion tuberculeuse. Grâce à eux, nous sommes en mesure de rechercher dans chaque ville, dans chaque village, dans chaque famille, s'il existe des sujets contaminés par le bacille ; nous pouvons établir la proportion de leur nombre par rapport à celui des sujets encore indemnes et chiffrer, par suite, l'*index tuberculeux* d'un groupement ethnique, d'une localité ou de tout un pays. Les données ainsi recueillies sont précieuses, non seulement parce qu'elles doivent nous servir à éveiller l'attention des intéressés ou celle des pouvoirs publics et à leur faire comprendre la nécessité de mesures défensives ou protectrices, mais aussi parce qu'elles nous apportent des éclaircissements sur les divers modes d'infection. Par exemple, elles peuvent nous fixer sur l'importance relative — encore si discutée — des bacilles d'origine *bovine* dans la contamination de l'homme.

On comprend donc que, déjà, de nombreuses recherches

aient été faites dans cette voie (1), et parmi les plus intéressantes par leurs résultats, je citerai celles publiées récemment par *Él. Metchnikoff*, *Ét. Burnet* et *L. Tarassevitch* (2) relatives à l'extension de la tuberculose dans les steppes des Kalmouks. Mais pour ce qui concerne les pays situés hors d'Europe, nous ne possédons que quelques statistiques dressées par *Römer* en Argentine, quelques faits relevés par *Peiper* en Afrique Orientale allemande et les observations méthodiquement effectuées par deux de mes élèves, les Drs *Wagon* en Guinée française (3) et *Noël Bernard* en Annam (4).

Aussi ai-je pensé qu'il serait utile d'étendre cette enquête et de l'entreprendre simultanément dans le plus grand nombre possible de nos colonies, en sollicitant le concours, sur lequel je savais pouvoir compter, des médecins militaires des troupes coloniales, celui des médecins des services d'assistance indigène, et celui du personnel de nos Instituts Pasteur coloniaux.

C'est un agréable devoir pour moi de remercier les nombreux collaborateurs qui ont ainsi répondu à mon appel. Je citerai leurs noms à l'appui des documents que chacun d'eux m'a envoyés.

Avant d'énoncer les résultats de ces recherches, je crois utile d'indiquer la technique suivant laquelle elles ont été uniformément effectuées. Chacun de mes correspondants a reçu, en même temps qu'une provision de tuberculine répartie en gros tubes à vaccin de 40 doses (*tuberculine glycérinée brute de Koch*), une instruction et un questionnaire.

L'instruction recommandait d'insérer, soit avec un vaccinostyle, soit avec une lancette, dans deux scarifications intéressant à peine le derme et faites sur l'un des bras, au niveau de la région deltoïdienne (comme s'il s'agissait d'une opération vaccinale), une gouttelette de tuberculine. Une première scarification devait toujours être faite sans tuberculine pour servir de témoin. Les sujets devaient être revus, pour le contrôle, le cinquième ou le sixième jour, afin d'éviter de noter comme positives des

(1) Calmette. Conférence internationale de la Tuberculose. Bruxelles, octobre 1910, et Calmette, V. Grysez et R. Letulle. *Presse Médicale*. 9 août 1911.
(2) Ces *Annales*, novembre 1911, p. 786.
(3) *Bull. Soc. de Path. exotique*, 12 janvier 1910.
(4) *Bull. Soc. de Path. exotique*. 11 octobre 1911.

réactions douteuses et fugaces qui se manifestent par une simple infiltration dermique, sans formation de la vésico-papule caractéristique entourée d'une zone irrégulièrement circulaire, de couleur rouge foncé chez les individus de race blanche.

Le questionnaire sollicitait des renseignements sur la fréquence et les formes de tuberculose observées, sur le mode d'alimentation des jeunes enfants, sur l'existence et la fréquence de la tuberculose bovine dans le pays.

Je priais en outre de classer les résultats autant que possible selon l'âge des sujets, de zéro à un an, de un à quinze ans et au-dessus de quinze ans. Je demandais enfin que l'enquête soit surtout faite dans les écoles et dans les villages indigènes.

Voici résumées, par groupes de colonies et par centres d'opérations, les données que j'ai pu recueillir.

Colonies françaises d'Afrique.

Afrique occidentale. — Résultats transmis par le Dr *Delrieu*, chef du service de santé du Gouvernement général de l'Afrique occidentale :

1° Sénégal.

Ville de *Saint Louis* (Drs Bourret et Bourragué) :

30 enfants de 1 à 15 ans de race blanche.	Réact. pos. : 3 = 10,0 p. 100
400 enfants de 1 à 15 ans de race noire ou métis.	Réact. pos. : 137 = 34,0 p. 100
106 sujets de race noire, au delà de 15 ans.	Réact. pos. : 32 = 30,2 p. 100

Banlieue (*Sor et Khor*) :

169 enfants de 1 à 15 ans (race noire) . . .	Réact. pos. : 20 = 11,8 p. 100
68 noirs au delà de 15 ans.	Réact. pos. : 13 = 19,0 p. 100

Tiraouane, cercle du Cayor (Dr Comméléran) :

Ecole indigène. —	59 enfants de 5 à 15 ans . .	Réact. pos. : 8 = 13,5 p. 100
Dispensaire. —	16 enfants de 0 à 1 an. . .	Réact. pos. : 1 = 6,2 p. 100
	63 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. : 8 = 12,6 p. 100
	110 sujets au delà de 15 ans.	Réact. pos. : 5 = 4,5 p. 100

Keur-Matar-Khaly, à 16 kilomètres à l'est de Tiraouane (village Ouoloff) :

40 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. : 4 = 10,0 p. 100
61 sujets au delà de 15 ans .	Réact. pos. : 7 = 11,4 p. 100

Maka-Gayben (village Ouoloff à 28 kilomètres de Tiraouane) :

9 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. pos. : 1 = 11,1 p. 100
39 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. : 2 = 5,1 p. 100
61 sujets de plus de 15 ans .	Réact. pos. : 6 = 9,8 p. 100

Bakel (D[r] Fouquernie) :

Douze villages de la Falémé ont fourni :

38 enfants de 0 à 1 an. . . Réact. pos. : 1 = 2,6 p. 100
301 enfants de 1 à 15 ans . . Réact. pos. : 38 = 12,6 p. 100
40 sujets de plus de 15 ans. Réact. pos. : 10 = 25,0 p. 100

Sedhiou (D[r] Cazeneuve), en Cazamance :

21 enfants de 0 à 1 an . . . Réact. pos. : 0
98 enfants de 1 à 15 ans. . . Réact. pos. : 0
159 sujets de plus de 15 ans . Réact. pos. : 2 = 1,2 p. 100

Bignona-Fogny, en Cazamance (D[r] H. Baisez), population Diolas :

59 enfants de 0 à 1 an . . Réact. pos. : 2 = 3,4 p. 100
163 enfants de 1 à 15 ans . . Réact. pos. : 29 = 17,8 p. 100
179 enfants de plus de 15 ans. Réact. pos. : 42 = 23,5 p. 100

Bammako. Niger, population Bambaras et Maure (D[r] André Léger) :

64 enfants de 0 à 1 an. . . Réact. pos. ; 0
258 enfants de 1 à 15 ans . . Réact. pos. : 31 = 12,0 p. 100
173 sujets de plus de 15 ans. Réact. pos. : 29 = 16,7 p. 100

Les Maures, voyageurs et commerçants, sont beaucoup plus atteints que les indigènes Bambaras. Sur 62 enfants Maures, 18, soit 20 p. 100, ont réagi; tandis que sur 186 enfants Bambaras, 13 seulement, soit 6,6 p. 100, ont fourni une réaction positive.

Moyenne générale pour le Sénégal :

207 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. pos. :	5 =	2,4 p. 100
1.573 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. :	280 =	17,8 p. 100
957 sujets de plus de 15 ans.	Réact. pos. :	146 =	15.2 p. 100
Ensemble : 2.737 sujets		431	15,1 p. 100

2° Guinée française.

Conakry (D[r] Bonneau) :

140 élèves des écoles, âgés de 5 à 15 ans . . Réact. pos. : 5 = 3,5 p. 100

Mamou (D[r] Chatenay) :

80 enfants de 1 à 15 ans . . . . Réact. pos. : 0
20 sujets de plus de 15 ans . . Réact. pos. : 1 = 5 p. 100

Goléah; Cercle de Kindia (D[r] Trautmann) :

40 enfants de 1 à 15 ans. . . Réact. pos. : 1 = 2,5 p. 100

Boké (D[r] Bougenault) :

116 enfants de 1 à 15 ans. . . Réact. pos. : 0 = 0 » p. 100

Moyenne générale pour la Guinée :

376 enfants de 1 à 15 ans.	Réact. pos. :	6 » =	1,6 p. 100
20 suj. de plus de 15 ans.	Réact. pos. :	1 » =	5,0 p. 100
Ensemble : 396 sujets.	Réact. pos. :	7 » =	1,8 p. 100

3° Côte-d'Ivoire.

Grand-Bassam (Dr F. Sorel), village de Mooussou, 2.000 habitants :

9 enfants de 0 à 1 an	Réact. pos. : 0
45 enfants de 1 à 15 ans	Réact. pos. : 6 = 13,3 p. 100
196 sujets de plus de quinze ans.	Réact. pos. : 25 = 12,7 p. 100

Bingerville (Dr Guerchet) :

60 enfants de 5 à 15 ans (écoles) . .	Réact. pos. 2 = 3,3 p. 100

Bouaké. Cercle de Baoulé-Hinterland (Dr Arlo) :

506 sujets inoculés au cours des tournées de vaccine	Réact. pos.: 36 = 7,1 p. 100

Moyenne générale pour la Côte-d'Ivoire :

816 sujets	Réact. pos. : 76 = 8,4 p. 100

Dans toute l'Afrique occidentale, les rapports des vétérinaires, en particulier celui du chef du service zootechnique, M. Teppaz, signalent la non existence de la tuberculose bovine.

Les enfants indigènes sont toujours nourris au sein jusqu'à six à huit mois. L'allaitement se continue jusqu'à dix-huit mois chez les garçons et deux ans chez les filles, mais mitigé par l'alimentation familiale qui comporte surtout du mil ou du riz, du poisson frais ou sec, du lait de brebis ou de chèvre, cru ou caillé. Chez certaines peuplades, comme les Diolas de Cazamance, s'il arrive qu'un enfant succombe parce que sa mère ne peut pas l'allaiter, celle-ci ne lui survit pas : les membres de sa famille se chargent de lui faire expier ce qu'ils considèrent comme un déshonneur.

Dans les cercles de l'intérieur, la tuberculose pulmonaire est la seule forme que l'on observe : encore est-elle extrêmement rare. En Cazamance, le Dr *Chatenay* signale deux cas de tuberculose osseuse. Celle-ci et les formes ganglionnaires sont plus fréquentes à la côte et dans les localités où les indigènes ont été depuis longtemps en contact avec des Européens.

On pouvait craindre que, chez les sujets de race noire, les réactions cutanées positives fussent difficiles à constater. L'expérience prouve qu'il n'en est rien, malgré l'absence de la zone irrégulièrement circulaire, de couleur rouge foncé, que présentent les individus de race blanche. L'apparition très nette de la vésico-papule et la persistance d'une auréole d'infiltration leucocytaire dans le tissu dermique, autour du point d'inoculation, ne laissent aucun doute à l'observateur attentif.

Afrique orientale. — Le Dr *Vaysse*, médecin-inspecteur, chef du service de santé du Gouvernement général de l'île, a bien voulu se charger d'organiser l'enquête qui sera ultérieurement étendue à tous les postes médicaux de la colonie. Il m'a fait parvenir dès à présent les résultats ci-après :

1° Ile de Madagascar :

Tananarive. — Dispensaires d'Ankadifotsy et d'Isotry (Dr Certain) :

70 enfants de 0 à 1 an . . . . Réact. pos. : 0
30 enfants de 1 à 15 ans . . . . Réact. pos. : 3 = 10 p. 100
26 sujets de plus de 15 ans . . Réact. pos. : 0

Hôpital (Dr Clouard) :

54 enfants de 1 à 15 ans . . . Réact. pos. : 7 = 13,0 p. 100

Province d'Andovoranto. Côte Orientale (Dr Violle) :

11 enfants de 0 à 1 an . . . Réact. pos. : 0
80 enfants de 1 à 15 ans. . . Réact. pos. : 1 = 1,2 p. 100
282 sujets de plus de 15 ans . Réact. pos. : 13 = 4,6 p. 100

Province de Tuléar (Dr Millon) :

70 enfants de 0 à 1 an. . . Réact. pos. : 1 = 1,4 p. 100
220 enfants de 1 à 15 ans . . Réact. pos. : 25 = 11,3 p. 100
177 sujets de plus de 15 ans. Réact. pos. : 22 = 12,4 p. 100

Moyennes générales pour Madagascar :

	151 enfants de 0 à 1 an. . . .	Réact. pos. : 1	= 0,6 p. 100
	384 enfants de 1 à 15 ans . . .	Réact. pos. : 36	= 9,3 p. 100
	487 sujets de plus de 15 ans . .	Réact. pos. : 35	= 7,1 p. 100
Ensemble :	1.022 sujets.	72	7,0 p. 100

La tuberculose bovine, d'après le rapport de *M. Carougeau*, chef du service vétérinaire, n'existe pas dans les provinces du Nord (Diégo-Suarez, Vohémar, Majunga, Tamatave). Par contre, celles du Sud sont gravement infectées et l'infection tend à se propager vers le centre de l'île. Les régions les plus contaminées sont Tuléar, Fort-Dauphin, Bétroka, Farafangana. A l'abattoir de Tananarive, sur 10 358 bœufs abattus en 1911, trois animaux ont été saisis en totalité et on a fait 767 saisies partielles. La proportion des bovidés trouvés tuberculeux a été de 7,4 p. 100. Tous provenaient du Sud de l'île, où l'infection, probablement d'importation récente, s'est rapidement étendue par suite du mode d'élevage en parcs nocturnes jamais nettoyés, où les

déjections s'accumulent, constituant d'infects cloaques pendant les saisons des pluies.

Dans l'Emyrne, les enfants sont toujours nourris au sein. A Tananarive, la mortalité humaine par tuberculose a varié de 1,6 à 6,5 pour 100 décès de 1901 à 1910. Les formes aiguës de granulie ou de méningite sont inconnues. Les tuberculoses ganglionnaires et pulmonaires sont les seules observées.

2° Ile de Mayotte-Seychelles (Dr Amigues) :

76 sujets de plus de 15 ans . . . . Réact. pos. : 13 = 17,1 p. 100

La population de cette île comprend un assez grand nombre de créoles et des indigènes plus ou moins métissés des diverses races de l'Inde et de l'Afrique Orientale.

3° Ile de la Réunion (Dr Vincent).

Saint-Denis. Population urbaine :

18 enfants de 0 à 1 an . .	Réact. pos. :	0
423 enfants de 1 à 15 ans. .	Réact. pos. :	172 = 40,6 p. 100
190 sujets de plus de 15 ans.	Réact. pos. :	154 = 81,0 p. 100

Sainte-Clotilde. Population rurale.

Indiens :

27 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. :	12 = 44,4 p. 100
30 sujets de plus de 15 ans .	Réact. pos. :	26 = 86,6 p. 100

Noirs :

121 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. :	49 = 40,6 p. 100
78 sujets de plus de 15 ans.	Réact. pos. :	12 = 79,4 p. 100

Créoles-blancs :

64 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. pos. :	28 = 43,7 p. 100
32 sujets de plus de 15 ans .	Réact. pos. :	24 = 75,0 p. 100

Mulâtres :

211 enfants de 1 à 15 ans. . .	Réact. posit. :	83 = 39,3 p. 100
50 sujets de plus de 15 ans.	Réact. posit. :	42 = 84,0 p. 100

Moyennes générales pour la Réunion :

18 enfants de 0 à 1 an . .	Réact. posit. :	0
846 enfants de 1 à 15 ans. .	Réact. posit. :	344 = 40,6 p. 100
380 sujets de plus de 15 ans.	Réact. posit. :	308 = 81,0 p. 100
Ensemble : **1.244** sujets.		652 52,4 p. 100

L'infection tuberculeuse est donc aussi commune dans cette vieille colonie que dans nos grandes villes industrielles françaises. Sa propagation est facilitée par les conditions d'existence

misérable de la population indigène, laquelle est constituée par un mélange des races aryennes, indo-malaises et africaines.

La tuberculose bovine est également très commune dans toutes les exploitations agricoles de l'île. Elle y a sans doute été introduite depuis fort longtemps par les animaux provenant d'Europe pour les croisements. Les bœufs importés du nord de Madagascar sont sains, mais après un an de séjour dans la colonie, un grand nombre d'entre eux sont déjà contaminés. C'est ainsi que sur 23 bœufs malgaches arrivés indemnes un an auparavant, 17 furent trouvés tuberculeux à l'abattoir de Saint-Denis (73,9 p. 100). Dans une ferme, sur 26 vaches laitières, le vétérinaire du Gouvernement en trouve 11 qui réagissent à la tuberculine, soit 42,3 p. 100.

30 p. 100 des laits du commerce sont reconnus infectés de bacilles tuberculeux par le Dr *Vincent* au laboratoire bactériologique de Saint-Denis.

Beaucoup d'enfants créoles sont alimentés au lait de vache. Mais les enfants indigènes sont nourris presque exclusivement au sein.

Les formes de tuberculose pulmonaire sont les plus commumunément observées ; les autres formes (granulies, méningites, etc.) ne sont pas plus rares qu'en France.

Afrique septentrionale. — Depuis le début de cette année 1912 seulement, les Drs *Edmond Sergent*, *Gillot* et *Murat* à l'Institut Pasteur d'Algérie, le Dr *Benoît*, délégué financier et maire de l'Arba, près d'Alger, et le Dr *Foley*, à Beni-Ounif (Sud-Oranais), ont pu soumettre à l'épreuve de la cutiréaction tuberculinique un petit nombre de sujets, européens ou arabes. Voici les résultats qu'ils ont bien voulu me faire parvenir :

1° *Institut Pasteur d'Algérie*. Ville d'*Alger* (Drs Gillot et Murat) :

27 enfants de 0 à 1 an	Réact. posit. :	1 = 3,7 p. 100
33 enfants de 1 à 5 ans. . . .	Réact. posit. :	4 = 12,1 p. 100
14 enfants de 5 à 15 ans . . .	Réact. posit. :	9 = 64,2 p. 100

Institut Pasteur d'Algérie. Banlieue d'*Alger* (Drs Edm. Sergent et L. Nègre) :

11 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. posit. :	0
39 enfants de 1 à 5 ans . .	Réact. posit. :	5 = 12,8 p. 100
5 enfants de 6 à 10 ans . .	Réact. posit. :	1 = 20,0 p. 100
5 enfants de 11 à 15 ans . .	Réact. posit. :	3 = 60,0 p. 100
2 sujets au delà de 15 ans. .	Réact. posit. :	2 = 100,0 p. 100

2° *L'Arba. — Douar Sidi naceur* (Drs Benoît et Edm. Sergent). Population

indigène strictement rurale, vivant sur les contreforts des montagnes de l'Atlas :

11 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. posit. :	0
44 enfants de 1 à 5 ans. . .	Réact. posit. :	4 = 9,0 p. 100
34 enfants de 6 à 10 ans . .	Réact. posit. :	12 = 35,2 p. 100
20 enfants de 11 à 15 ans . .	Réact. posit. :	10 = 50,0 p. 100
12 sujets de 16 à 20 ans . .	Réact. posit. :	10 = 83,3 p. 100
17 sujets de 21 à 30 ans . .	Réact. posit. :	12 = 70,6 p. 100
15 sujets de 31 à 40 ans . .	Réact. posit. :	15 = 100,0 p. 100
7 sujets de 41 à 50 ans . .	Réact. posit. :	7 = 100,0 p. 100
5 sujets de 51 à 70 ans . .	Réact. posit. :	5 = 100,0 p. 100

3° *Oasis de Figuig*, près Beni-Ounif, Sahara marocain (Dr Foley). Berbères et Arabes du village ou de tribus nomades provisoirement sédentaires dans la région.

3 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. posit. :	0
67 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. posit. :	4 = 6,0 p. 100
64 Arabes ou Berbères au delà de 15 ans	Réact. posit. :	14 (1) = 22.0 p. 100
1 Juif	Réact. posit. :	= 0

La moyenne générale pour l'Algérie est :

52 enfants de 0 à 1 an. . . .	Réact. posit. :	1 = 1,8 p. 100
261 enfants de 1 à 15 ans. . .	Réact. posit. :	52 = 19,9 p. 100
123 sujets de plus de 15 ans.	Réact. posit. :	65 = 52,8 p. 100
Ensemble : **436** sujets		118 = 26 p. 100

Colonies françaises d'Amérique.

Guadeloupe (Dr Sauzeau de Puyberneau).

Basse-Terre :

8 enfants de 0 à 1 an. . . .	Réact. posit. :	0
336 enfants de 1 à 15 ans . . .	Réact. posit. :	128 = 38 p. 100
257 sujets de plus de 15 ans . .	Réact. posit. :	113 = 44 p. 100

Asile d'aliénés de Basse-Terre :

100 sujets de plus de 15 ans. .	Réact. posit. :	45 = 45 p. 100

Ile de la Désirade (1 579 habitants) :

301 sujets de plus de 15 ans .	Réact. posit. :	109 = 36,2 p. 100

Martinique (Drs Noc, Stévenel et Cozanet) :

227 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. posit. :	81 = 35.6 p. 100
177 sujets de plus de 15 ans .	Réact. posit. :	101 = 57,0 p. 100

La moyenne générale pour ces îles des Antilles est :

8 enfants de 0 à 1 an . .	Réact. posit. :	0
563 enfants de 1 à 15 ans. .	Réact. posit. :	209 = 37,1 p. 100
834 sujets de plus de 15 ans.	Réact. posit. :	358 = 44,1 p. 100
Ensemble : **1.405** sujets.		577 41 » p. 100

(1) Parmi ces 14 réactions positives figurent 6 malades de l'infirmerie indigène, cliniquement tuberculeux (3 tub. pulmonaires; 1 ancien pleurétique guéri depuis 6 mois; 1 adénite cervicale et 1 lupus de la face). Tous les autres étaient des sujets bien portants ou atteints d'affections légères variées.

Le Dr *Noc* signale que les formes ganglionnaires de tuberculose sont fréquentes chez les enfants ; les formes pulmonaires graves, surtout chez les créoles noirs et métis.

La tuberculose bovine n'existe pas ou serait extrêmement rare d'après les vétérinaires des Antilles.

Les enfants sont nourris exclusivement au sein à la campagne.

Dans les villes, l'habitude créole est de faire bouillir deux fois le lait avant qu'il soit vendu au marché, afin d'éviter sa trop rapide altération pendant les transports.

Sur 21 soldats européens, 19 ont fourni une réaction positive, et sur 63 soldats créoles, 39 ont réagi. Dans la population civile, les sujets d'origine européenne donnent aussi un pourcentage de réactions positives de près d'un tiers plus élevé que celui des créoles; mais la tuberculose évolue beaucoup plus vite chez ces derniers. Jadis, les noirs esclaves étaient rarement atteints. Dans l'intérêt du planteur ils étaient bien logés, bien nourris, bien vêtus et on leur prodiguait des soins médicaux pour éviter les maladies susceptibles de restreindre le rendement de leur travail. La liberté a, dans une certaine mesure, changé à leur détriment leurs conditions d'existence et leur a donné la phtisie. Ils se contaminent maintenant les uns les autres dans les cases sordides où ils demeurent et dans les villes ou villages où leurs habitations, malproprement tenues, forment des quartiers qu'il est fort difficile d'assainir. En outre, l'alcoolisme fait parmi eux de terribles ravages et contribue puissamment à diminuer leur résistance.

Colonies françaises d'Asie.

Tonkin. — A l'*hôpital indigène d'Hanoï*, le Dr Monzels a soumis 293 sujets à l'épreuve de la cutiréaction tuberculinique. Il a relevé 146 réactions positives, soit 49,8 p. 100 ainsi réparties :

3	enfants de 0 à 1 an. . .	Réact. posit. : 0
21	enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. posit. : 7 = 34,3 p. 100
269	sujets au delà de 15 ans.	Réact. posit. : 139 = 51,6 p. 100

A la *Prison civile de la même ville*, le Dr Gaudacheau, sur 455 sujets, trouve 147 réactions positives, soit 32,3 p. 100 dont :

3 enfants de 0 à 1 an. . .	Réact. posit. : 0
16 enfants de 1 à 15 ans . .	Réact. posit. : 3 = 18,8 p. 100
436 sujets au delà de 15 ans .	Réact. posit. : 147 = 33,7 p. 100

Le Dr Gaudacheau relève, d'autre part :

A l'*École Franco-Annamite de Yen-Phu* (Hanoï) :

Sur 255 élèves de 6 à 15 ans .	Réact. posit. : 81 = 31,8 p. 100
6 professeurs	Réact. posit. : 5 = 83,3 p. 100

Au village de *Thaï-Hà-Ap*, à 5 kilomètres d'Hanoï :

Sur 20 sujets adultes	Réact. posit. : 12 = 72,5 p. 100

Au village de *Gia-lam*, près de Hanoï, sur la rive gauche du Fleuve Rouge :

Sur 3 enfants de 0 à 1 an .	Réact. posit. : 0
Sur 96 enfants de 1 à 15 ans .	Réact. posit. : 12 = 12,4 p. 100
Sur 3 adultes	Réact. posit. : 0

Au village de *Ha-Dong*, à 11 kilomètres de Hanoï, sur la rive gauche du Fleuve Rouge :

Sur 3 enfants de 0 à 1 an .	Réact. posit. : 0
Sur 323 enfants de 1 à 15 ans.	Réact. posit. : 37 = 10,2 p. 100
Sur 33 adultes	Réact. posit. : 9 = 27,2 p. 100

A l'*École de Bac-Ninh*, le Dr Martin trouve :

Sur 113 enfants de 5 à 15 ans.	Réact. posit. : 18 = 15,9 p. 100

et à la *Prison civile de Bac-Ninh* :

Sur 77 sujets adultes	Réact. posit. : 57 = 74,0 p. 100

Les moyennes générales pour le Tonkin sont donc :

12 enfants de 0 à 1 an . . .	Réact. posit. : 0
824 enfants de 1 à 15 ans. . .	Réact. posit. : 158 = 19,1 p. 100
844 sujets au delà de 15 ans .	Réact. posit. : 369 = 43,7 p. 100
Au total : 1.680 sujets ont fourni	Réact. posit. : 527 31,4 p. 100

ANNAM. — A *Hué*, ville de 60.000 habitants, les Drs *P. Noël Bernard*, *L. Koun* et *Ch. Meslin* ont soumis à l'épreuve 2825 sujets en divers milieux (écoles, miliciens, fonctionnaires indigènes, commerçants, ouvriers et paysans, prisonniers et filles publiques).

Les résultats, d'après l'âge, se classent comme suit :

91 enfants de 0 à 1 mois	Réact. posit. :	0	
77 enfants de 2 mois à 2 ans. . .	Réact. posit. :	2 =	2,6 p. 100
133 enfants de 3 à 5 ans	Réact. posit. :	13 =	9,8 p. 100
206 enfants de 6 à 10 ans	Réact. posit. :	51 =	24,7 p. 100
406 enfants de 11 à 15 ans	Réact. posit. :	118 =	23,3 p. 100
532 sujets de 16 à 20 ans	Réact. posit. :	175 =	32,9 p. 100
591 sujets de 21 à 30 ans	Réact. posit. :	264 =	44,7 p. 100
699 sujets de 31 à 70 ans	Réact. posit. :	429 =	63,5 p. 100
Sur **2.825** sujets		1.052	37,2 p. 100

Et d'après les milieux :

Sur **720** élèves des écoles	Réact. posit. :	151 =	21,1 p. 100
Sur **127** étudiants des écoles supérieures de Mandarinat, membres du corps enseignant et haut personnel des bureaux	Réact. posit. :	90 =	70,8 p. 100
Sur **58** prisonniers	Réact. posit. :	41 =	80,1 p. 100
Sur **23** filles publiques	Réact. posit. :	8 =	34 8 p. 100
Sur **23** mères de 22 à 40 ans, à la Maternité	Réact. posit. :	13 =	56,5 p. 100
Sur **23** enfants de 4 à 15 jours, à la Maternité.	Réact. posit. :	0 =	0 » p. 100

A *Quang-Binh*, sur **157** sujets de tous âges, le D[r] Poux trouve 70 réactions positives, soit 44,6 p. 100, et à *Fai-foo*, chef-lieu du Quang-Nam, sur **27** travailleurs chinois immigrés, âgés de 22 à 45 ans, 27, soit 100 p. 100 de réactions positives.

Au total, en *Annam*, 3.009 sujets fournissent 1.149 réactions positives, soit une moyenne de 38,1 p. 100

Cochinchine (D[r] Brau).

A l'*École cantonale de Govap* :

85 enfants de 6 à 15 ans. . . . . Réact. posit. : 10 = 11,8 p. 100

A l'*École d'An-loï-Xa* :

65 enfants de 6 à 15 ans. . . . . Réact. posit. : 10 = 15,4 p. 100

A l'*École de Gia-Dinh*, près de Saïgon :

125 enfants de 6 à 15 ans . . . . Réact. posit. : 19 = 15,2 p. 100

A l'*École normale de Gia-Dinh* :

57 sujets de 15 à 20 ans . . . . Réact. posit. : 14 = 24,6 p. 100

Au total, en Cochinchine, sur **332** sujets, **53** réactions positives, soit une moyenne de 16 p. 100; mais cette statistique ne comprend aucun adulte âgé de plus de 20 ans.

CAMBODGE (Dr Crossouard).

A *Pnom-Penh* :

43 enfants de 0 à 1 ans.	Réact. posit. : 3 = 7 p. 100
75 enfants de 1 à 15 ans.	Réact. posit. : 12 = 16 p. 100

A *Kompong-Cham*, 125 sujets inoculés ne fournissent aucun résultat positif.

A *Soai-Rieng* :

40 enfants de 1 à 15 ans	Réact. posit. : 0
128 sujets adultes	Réact. posit. : 4 = 3,1 p. 100

Au total, au *Cambodge*, sur 411 sujets, 19 réactions positives, soit 4,6 p. 100. La tuberculose est d'ailleurs signalée par les médecins comme extrêmement rare dans ce pays. Elle n'y existe que depuis l'invasion chinoise et annamite. Les Européens y sont très peu nombreux.

La tuberculose bovine est inconnue dans toute l'Indochine, sauf au Cambodge, où elle a été signalée par M. *Mérals* sur des animaux importés d'Europe pour le croisement avec les races indigènes. Au Tonkin et en Annam, les vétérinaires du Gouvernement n'ont jamais eu l'occasion de l'observer. M. *Bauche*, de Hué, attribue cette immunité à ce que les animaux vivent partout au grand air, quelquefois seulement parqués la nuit, dans des hangars ouverts à tous les vents.

Les enfants indigènes ne boivent jamais de lait de vache. Ils sont alimentés exclusivement au sein ou avec du riz mâché par la mère et imprégné de salive. Les Drs *Brau* en Cochinchine, et *Noël Bernard* en Annam, ont pris la peine de relever les antécédents d'un certain nombre de sujets qui leur ont fourni des réactions positives. Ils ont pu constater la fréquence des contaminations familiales. C'est ainsi que, dans une famille de 13 personnes, à Hué, 11 réagirent positivement. Or, dans cette famille, une jeune femme de vingt-cinq ans venait de succomber à la tuberculose pulmonaire.

Les formes les plus communément observées sont les tuberculoses pulmonaires et ganglionnaires. L'extrême rareté des tuberculoses osseuses ou articulaires est affirmée par tous les médecins.

L'infection tuberculeuse a probablement été introduite depuis

longtemps en Indochine par les Chinois, car les centres les plus atteints sont ceux qui ont été le plus anciennement pénétrés par la civilisation chinoise. En Chine, la tuberculose est extrêmement commune, plus peut-être qu'en Europe dans toutes les grandes villes. On sait aussi qu'au Japon sa fréquence est considérable et que, dans ce pays, les localisations primitives intestinales s'observent couramment chez les adultes comme chez les enfants, bien qu'ils ne soient jamais alimentés au lait de vache. La tuberculose bovine n'a d'ailleurs été observée au Japon qu'à partir de 1875, à la suite d'importations de bétail étranger (*Kitasato*) (1).

Colonies françaises d'Océanie.

De Nouvelle-Calédonie et de Tahiti, les Drs *Ortholan* et *Heusch* n'ont pu m'adresser que quelques renseignements d'ordre général. Tous deux insistent sur ce fait déjà bien connu que la tuberculose et la lèpre, récemment importées par les Européens et par les Chinois, font aujourd'hui de terribles ravages dans toutes les îles du Pacifique. La tuberculose décime les habitants des Loyalti, des Nouvelles-Hébrides, de Tahiti et des Marquises. Dans la population canaque de Nouvelle-Calédonie, elle se répand aussi avec une intensité terrifiante. Les formes aiguës de granulie et les tuberculoses pulmonaires évoluant en trois à quatre mois sont le plus communément observées. Chez les enfants on trouve souvent des formes ganglionnaires, mais jamais de tuberculoses osseuses ou articulaires.

Il semble que l'intensité de l'infection tuberculeuse, dans chaque île, soit proportionnelle au nombre d'Européens. Il est établi, d'autre part, que les Canaques, transportés dans les villes de la Côte occidentale d'Amérique, y succombent très rapidement à la tuberculose. C'est ainsi qu'il y a quelques années, un spéculateur anglais introduisit comme colons à Lima (Pérou), deux mille indigènes des Marquises. En moins de dix-huit mois les trois quarts d'entre eux étaient morts de phtisie !

Les indigènes de races polynésiennes ne boivent pas de lait de vache. Du reste, les bovidés sont d'importation très récente

(1) *Zeitsch. für Hygiene*, 16 déc. 1904, p. 471.

dans leurs îles et l'élevage n'y est encore pratiqué que dans une mesure fort restreinte.

Conclusions.

De l'ensemble des faits réunis au cours de cette enquête sur l'épidémiologie de la tuberculose dans les Colonies françaises, se dégagent les conclusions suivantes :

Dans les régions tropicales, la tuberculose n'est pas sensiblement influencée par les climats. Sa fréquence est en rapport direct avec la civilisation. Elle est extrêmement rare parmi les populations indigènes de race noire, dans les pays où l'Européen n'a pénétré que depuis peu d'années ; mais la proportion des sujets contaminés s'accroît chez elles avec l'intensité des échanges commerciaux et de l'immigration étrangère.

Aucune des races qui peuplent nos colonies ne présente d'immunité contre l'infection tuberculeuse. Toutes accusent au contraire une sensibilité d'autant plus grande qu'elles ont été précédemment mieux protégées contre l'importation du bacille.

Les races qui se montrent le plus sensibles et chez lesquelles la tuberculose se manifeste dans ses formes le plus rapidement mortelles sont les dernières venues à la civilisation : Polynésiens de l'Océanie, Nègres de l'Hinterland Africain. Dans nos anciennes Colonies de la Réunion et des Antilles (Martinique et Guadeloupe), l'infection tuberculeuse est à peu près aussi intense que dans les grandes villes européennes : 81 p. 100 à la Réunion chez les sujets âgés de plus de quinze ans, 57 p. 100 à la Martinique.

Dans les Colonies plus récentes, on constate que le nombre des sujets infectés progresse partout où des établissements européens ont été créés et, qu'inversement, les formes de tuberculose observées sont d'autant moins graves que l'infection est plus répandue et plus ancienne.

Ces faits apportent une intéressante confirmation aux conceptions basées sur mes expériences avec *C. Guérin* et que j'ai développées déjà dans plusieurs notes ou mémoires (1). Ils

(1) Voir *La Presse Médicale*, 21 février 1912 (Quelques aperçus nouveaux sur la question de la vaccination contre la tuberculose).

montrent que, tout comme les singes transportés des forêts africaines dans nos villes d'Europe, les hommes qui sont nés et ont grandi à l'abri de l'infection tuberculeuse, par exemple les Canaques des îles polynésiennes ou les Nègres des villages soudanais, se contaminent avec la plus grande facilité lorsqu'ils se trouvent exposés à un contact infectant. En outre, la tuberculose affecte presque constamment chez eux des formes graves (granulie ou phtisie à évolution rapide). Par contre, là où l'infection bacillaire est depuis longtemps répandue, le nombre des sujets chez lesquels les réactions tuberculiniques locales révèlent l'existence de lésions latentes ou occultes, est énorme; la contamination est alors précoce : elle s'effectue dès le jeune âge et les formes de tuberculose observées sont presque toujours chroniques, avec tendance aux localisations osseuses, articulaires ou viscérales.

L'enquête qui précède nous apporte d'autres enseignements précieux.

C'est ainsi qu'*il n'est plus possible de soutenir l'hypothèse, formulée par Von Behring en 1903, que la tuberculose pulmonaire de l'adulte n'est que la manifestation tardive d'une infection, le plus souvent d'origine bovine, contractée dès les premiers mois de la vie à la suite de l'ingestion de lait de vache bacillifère.*

Nous constatons d'abord que, parmi les populations indigènes de l'Afrique Occidentale par exemple, qui sont encore peu atteintes, ou parmi celles d'Indochine qui le sont davantage, les enfants sont trouvés constamment indemnes jusqu'au sevrage. Ce n'est qu'à cette époque que s'offrent à eux les occasions de contacts infectants familiaux ou autres. En Indochine, les grands-parents, le père, la mère ou les enfants plus âgés mâchent le riz et l'imprègnent de leur salive avant de l'introduire dans la bouche des tout petits. En Afrique occidentale on fait de même pour le couscouss. Plus tard la pipe, le crachoir à bétel ou la noix de Kola à chiquer passent d'un membre de la famille à l'autre. On ne saurait donc être surpris de ce que, là où elle existe, l'infection se propage avec une extrême facilité, et beaucoup plus souvent par les voies digestives que par les voies respiratoires.

Dans aucun cas, du moins en Afrique Occidentale, aux

Antilles, en Indochine et en Océanie, l'origine bovine de la tuberculose ne peut être accusée ni même soupçonnée, puisque les jeunes enfants ne boivent jamais de lait de vache et que les races de bovidés indigènes, lorsqu'il en existe, sont encore complètement épargnées par l'infection tuberculeuse. Dans le sud de Madagascar et à la Réunion seulement, la maladie, d'importation européenne pour l'espèce bovine comme pour l'espèce humaine, commence à se répandre. Il est possible qu'elle intervienne alors pour une faible part comme facteur de contamination de l'homme.

Mais on ne peut qu'être frappé de ce fait qu'en Annam par exemple où, dans certains milieux (Écoles supérieures de mandarinat, prisons, etc...), la proportion des sujets infectés atteint ou dépasse 80 p. 100, chiffre égal à celui que nous trouvons dans la population ouvrière de nos grandes villes du nord de la France, la contamination d'origine bovine n'entre pour aucune part. Il en est de même dans les îles polynésiennes où la tuberculose est si extraordinairement fréquente et meurtrière. C'est donc que, dans ces pays, *la contagion interhumaine intervient seule*, avec une intensité égale ou supérieure à celle qui s'exerce au sein de nos populeuses agglomérations d'Europe.

ACTION COMBINÉE DU MANGANÈSE ET DU ZINC
SUR LE DÉVELOPPEMENT
ET LA COMPOSITION MINÉRALE DE L'ASPERGILLUS NIGER

par Gabriel BERTRAND et M. JAVILLIER.

Nous avons déjà exposé, dans un précédent mémoire, le but que nous poursuivons dans nos études actuelles sur l'*Aspergillus niger* (1). Il suffira donc de le rappeler brièvement. Lorsqu'on introduit dans le milieu de culture d'une plante, à côté des éléments fondamentaux comme l'azote, le phosphore, le potassium, certains éléments tels que le manganèse, le zinc ou le bore, — ceux-ci à l'état de traces seulement, — on obtient des accroissements de récolte, parfois même considérables. Il est clair que ces augmentations ne se manifestent pas indifféremment quels que soient l'élément catalytique employé, la dose ajoutée et l'espèce végétale envisagée. Il appartient à l'expérience de décider, parmi les éléments, ceux qui sont favorables et à quelles doses, pour une espèce donnée. Pour nous en tenir à l'*Aspergillus niger*, rappelons que le zinc exerce sur lui une action particulièrement puissante et que le manganèse se montre également, à des doses il est vrai plus élevées, un adjuvant remarquable de sa végétation.

Nous nous sommes demandé si l'association du zinc et du manganèse n'aurait pas une action favorisante plus marquée que l'emploi d'un seul de ces éléments. La question est d'un grand intérêt au point de vue théorique, et elle apparaît plus capitale encore au point de vue pratique, puisque, si les résultats sont positifs, on peut espérer les voir s'étendre aux plantes de grande culture, c'est-à-dire à des végétaux dont l'importance économique est considérable.

Nous avons donc recherché quelle action exerce sur le développement de l'*Aspergillus niger* la présence simultanée du manganèse et du zinc dans son milieu de culture. Les expériences ont été préparées comme nous l'avons décrit dans un

(1) Ces *Annales*, 4e série, t. XI, p. 241, 1912.

précédent mémoire, avec des corps aussi purs que possible. Après un même temps de végétation, nous avons comparé les poids de récolte obtenus en l'absence de manganèse et de zinc, en présence de zinc seul, de manganèse seul, enfin en présence de ces deux éléments réunis.

Le tableau ci-après résume les résultats obtenus :

FORME des vases.	VOLUME du liquide.	TEMPÉRATURE	DURÉE de la culture.	TÉMOINS — Récoltes.	ZINC		MANGANÈSE		Zn + Mn. — Récoltes.
					Dilutions.	Récoltes.	Dilutions.	Récoltes.	
	c.c.	deg.	jours.	gr.		gr.		gr.	gr.
Matras de 2 litres.	250	32	4	1 03	1/100.000	2 38	1/2.500	1 55	2 70
	Id.	Id.	Id.	1 12	Id.	2 57	1/500	1 33	2 94
	Id.	33	Id.	1 01	Id.	2 23	1/5.000	1 42	2 38
	Id.	Id.	Id.	1 70	Id.	3 01	1/10.000	2 40	3 67
	Id.	Id.	Id.	1 31	1/500.000	3 18	Id.	2 23	3 72
	Id.	Id.	Id.	1 33	Id.	2 53	Id.	2 38	2 98
	Id.	27	6	1 22	Id.	2 61	Id.	2 65	2 80
	Id.	31	Id.	2 18	Id.	2 80	Id.	2 84	2 90
	Id.	Id.	Id.	2 05	Id.	2 87	Id.	2 90	3 10
	Id.	Id.	Id.	2 12	Id.	2 87	Id.	2 92	3 08
Cuvettes rectang.	250	34	6	1 45	1/500.000	4 10	1/5.000	2 79	4 35
Flacons cylindriques de 0 lit. 500.	100	32	5	0 71	1/25.000.000	1 09	1/25.000	0 82	1 16
	Id.	Id.	Id.	0 71	1/10.000.000	1 11	1/10.000	0 78	1 13
	Id.	Id.	Id.	0 71	1/1.000.000	1 20	1/1.000	0 83	1 12
Flacons coniques de 1 lit. 5.	500	27	100 h.	3 05	1/20.000.000	4 43	1/10.000	3 77	4 82
	Id.	33	Id.	2 80	1/25.000.000	3 94	1/25.000	3 55	4 39
	Id.	Id.	Id.	3 00	Id.	4 54	Id.	3 54	4 77
	Id.	Id.	Id.	2 90	1/10.000.000	4 16	1/10.000	4 40	5 27
	Id.	Id.	Id.	3 00	Id.	5 21	Id.	3 81	5 68
	Id.	Id.	Id.	3 00	1/5.000.000	5 51	1/5.000	4 25	6 17
	Id.	Id.	4	1 86	1/50.000	3 85	Id.	3 25	5 12
	Id.	Id.	Id.	1 92	Id.	4 13	Id.	2 95	5 17

L'examen de ce tableau montre nettement qu'*on obtient des poids de récolte plus grands par l'addition simultanée de zinc et de manganèse que par l'addition d'un seul de ces métaux.*

Le poids de matière sèche obtenu avec le liquide témoin étant 100, les quantités de matières construites se sont élevées *au plus* : en présence de manganèse seul à 170, en présence de zinc seul à 242, et en présence de ces deux éléments réunis à 284. Ce sont là, du moins, les chiffres maxima atteints dans les expériences en matras ou en flacons, résumées ci-dessus. Dans l'expérience en cuvettes rectangulaires, également citée, les chiffres se sont trouvés les suivants :

En l'absence de zinc et de manganèse	100
En présence de manganèse	192
En présence de zinc	282
En présence de zinc et de manganèse	300

Remarquons que le zinc et le manganèse additionnent leur action, dans une certaine mesure, non seulement aux doses optima de chacun d'eux, mais aussi aux doses inférieures à celles-ci.

Une nouvelle question se greffe naturellement sur celle que nous venons de résoudre. Comment se comporte l'*Aspergillus* vis-à-vis du zinc et du manganèse, au point de vue de la fixation de ces métaux, lorsqu'il se trouve en présence de l'un et de l'autre à la fois?

Lorsque le zinc est seul, nous savons qu'il est fixé intégralement si les doses de métal sont extrêmement petites, puis partiellement lorsque celles-ci s'élèvent. Avec le manganèse, nous n'avons jamais vu, au moins pour les doses auxquelles son action était nettement marquée, le métal fixé en totalité; les quantités fixées étaient toujours très éloignées des quantités offertes. Que pouvait-il se produire avec les deux éléments associés? La plante fixerait-elle chacun d'eux dans les mêmes proportions que s'il était seul, ou bien, au contraire, en fixerait-elle une proportion différente, le taux de fixation de l'un et l'autre élément pouvant ou s'abaisser ou s'élever? L'expérience seule était capable de répondre à ces questions, de faire connaître laquelle des hypothèses possibles se réalise.

Nous avons d'abord cherché à résoudre la question de la

fixation du manganèse en présence du zinc. La possibilité de doser le manganèse dès le millième de milligramme (1) rendait, en effet, le problème plus abordable de ce côté.

Voici les résultats obtenus dans un certain nombre d'expériences : Nous faisons figurer dans le tableau ci-dessous : d'une part, les quantités absolues de manganèse fixées par les cultures faites en présence de ce métal seul et en présence de ce métal associé au zinc ; et, d'autre part, les quantités de manganèse fixées, dans l'un et l'autre cas, par 100 de matière sèche. Il est clair que ce sont ces derniers chiffres qu'il importe surtout de comparer entre eux.

	VOLUME du milieu.	POIDS de Zn introduit.	DILUTION du zinc.	POIDS de Mn introduit.	DILUTION du Mn.	POIDS secs des récoltes.	POIDS de Mn fixé.	Mn FIXÉ p. 100 de matière sèche.
	c.c.	milligr.		milligr.		gr.	milligr.	
1	100	0	»	4	1/25.000	0 82	0 052	0,0063
	100	0 004	1/25.000.000	4	1/25 000	1 16	0 090	0,0078
2	100	0	»	10	1/10.000	0 78	0 115	0,0148
	100	0 01	1/10.000.000	10	1/10.000	1 13	0 225	0,0199
3	250	0	»	25	1/10.000	2 38	0 190	0,0080
	250	0 5	1/500.000	25	1/10.000	2 98	0 560	0,0186
4	250	0	»	50	1/5.000	1 42	0 280	0,0197
	250	2 5	1/100.000	50	1/5.000	2 38	0 475	0,0199
5	500	0	»	20	1/25.000	3 54	0 180	0,0050
	500	0 02	1/25.000.000	20	1/25.000	4 77	0 300	0,0062
6	500	0	»	50	1/10.000	3 81	0 340	0,0088
	500	0 05	1/25.000.000	50	1/10.000	5 68	1 100	0,0194

(1) G. Bertrand, *Bull. Soc. Chim.*, 4e s., t. IX, p. 361, 1911.

Ces résultats montrent que *le manganèse s'accumule en proportion plus élevée lorsqu'il est associé au zinc que lorsqu'il est seul.*

Toutefois ce fait ne semble exact qu'au-dessous d'une certaine limite. Évident lorsque les doses de zinc et de manganèse introduites dans le milieu de culture sont très petites, il perd de sa netteté lorsque les doses d'éléments catalytiques s'élèvent.

Ainsi, dans l'expérience IV, où la dose de manganèse atteint 1/5.000 et celle de zinc 1/100.000, la proportion de manganèse fixée reste, en présence de zinc, sensiblement la même qu'en l'absence de ce métal. Peut-être même le phénomène prend-il une allure inverse lorsque les doses des éléments catalytiques s'élèvent encore davantage. Mais nous nous bornerons à considérer le cas des petites doses, cas qui est d'ailleurs celui des milieux naturels où zinc et manganèse ne se présentent, en général, qu'à l'état de traces.

Un phénomène du même ordre se produit-il avec le zinc? C'est-à-dire, y a-t-il fixation supplémentaire de zinc en présence de manganèse? Pour les doses extrêmement petites, celles que l'un de nous a qualifiées de « doses nécessaires » et de « doses utiles » (1), la fixation du zinc étant totale lorsque cet élément se trouve seul, la question ne se pose pas. Elle ne peut être envisagée que dans le cas où le zinc est en excès dans le milieu et cesse d'être complètement utilisable sans être toxique.

Or, ces doses qui débutent, d'après des expériences anciennes, vers le 250.000ᵉ, sont encore d'un ordre de grandeur tel qu'elles se prêtent mal à des déterminations quantitatives exactes, à moins que l'on multiplie beaucoup les cultures pour opérer sur une forte quantité de mycélium. Nous nous sommes contentés, dans la plupart des cas, de vérifier que le zinc était présent dans les récoltes obtenues avec des milieux additionnés de zinc et de manganèse, comme dans les récoltes privées de ce dernier élément.

Dans l'une de nos expériences (exp. IV), où le dosage précis était possible, nous avons trouvé :

(1) M. Javillier, *Thèse de doctorat ès sciences*. Paris, 1908.

	Poids de récolte en grammes.	Zinc fixé	
		Par récolte en milligr.	pour 100 de matière sèche en milligr.
Culture en présence de Zn (poids absolu de Zn : 2 millig. 5; dilution : 1/100.000)	2,23	0,55	0.024
Culture en présence de Zn et de Mn (Zn comme ci-dessus; poids absolu de Mn : 50 milligr.; dilution du Mn : 1/5.000)	2,38	0,51	0,021

Le zinc est donc fixé par la moisissure, en présence comme en l'absence du manganèse; mais, dans l'expérience considérée, le phénomène de fixation supplémentaire ne s'est pas manifesté. Si l'on remarque que la dose de zinc employée dans cet essai a été relativement grande, on est conduit à admettre que nous avions sans doute atteint la zone, signalée à propos du manganèse, où le phénomène d'accumulation cesse d'être observable.

Ce n'est pas seulement sur leur fixation réciproque que les deux éléments catalytiques ajoutés au milieu de culture influent, *c'est sur la fixation globale des éléments minéraux.* Le zinc seul ou le manganèse seul suffisent déjà à accroître la minéralisation totale de la plante. Voici, pour en témoigner, quelques chiffres obtenus dans des expériences faites, dans des conditions diverses, en présence de doses variées et toujours très petites de zinc ou de manganèse :

	Proportion de cendres p. 100 de mycélium sec obtenu :	
	en l'absence de Zn et de Mn.	en présence de Zn.
Expérience 7	3,25	3,78
Expérience 8	3,29	3,42
		en présence de Mn.
Expérience 9	2,95	3,10
Expérience 10	3,70	3,80
Expérience 11	3,72	3,81

Cette accumulation de matière minérale se manifeste aussi bien lorsque de petites quantités de zinc ou de manganèse interviennent à la fois et, à part une exception dans le tableau

ci-dessous, se trouve même plus marquée. Il est évident qu'il ne faut comparer entre eux que les chiffres d'une même expérience.

	PROPORTION DE CENDRES P. 100 DE MYCÉLIUM SEC OBTENU :			
	en l'absence de Zn et de Mn.	en présence de Zn.	en présence de Mn.	en présence de Zn et de Mn.
	—	—	—	—
Expérience 1.	3,25	3,37	3,39	3,61
Expérience 2.	3,25	3,80	3,47	3,63
Expérience 3.	3,65	3,71	3,89	4,30

Ces faits ne sont pas isolés. Déjà, chez les plantes supérieures, on a vu le taux des cendres s'accroître sous l'influence du manganèse ajouté au sol comme engrais. L'un de nous l'a observé sur l'avoine (1), et Passerini sur le lupin (2).

Il est donc permis de penser que nous nous trouvons là en présence d'un fait d'ordre vraiment général.

En résumé, les observations consignées dans ce mémoire établissent une notion nouvelle : celle de l'action cumulative des éléments catalytiques; elles nous paraissent, à ce titre, présenter un réel intérêt pratique dès l'instant où on les étendra aux végétaux de grande culture (3).

Ces observations sont en outre d'accord avec la théorie qui inspire nos recherches, théorie d'après laquelle les éléments rares de l'organisme, loin d'être des éléments sans intérêt physiologique, loin même de n'être que de simples excitants énergétiques du protoplasma, sont en fait des éléments actifs de la cellule, des catalyseurs indispensables aux transformations chimiques dont les êtres vivants sont le siège.

(1) G. Bertrand, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*. t. CXLI, p. 1255, 1905.

(2) *Boll. Ist. agr. Scandici*, p. 3, 1905.

(3) A peine avions-nous énoncé cette notion (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII, p. 900, mars 1911), qu'elle recevait une vérification et, en même temps, une extension par les intéressantes recherches de J. Stoklasa (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLII p. 1340, mai 1911). Ces recherches établissent en effet, que le manganèse et l'aluminium associés à doses convenables accroissent, plus que chacun de ces métaux pris isolément, les récoltes de blé, de seigle, d'orge, d'avoine et de sarrazin.

ACTION COMPARÉE
DES MICROBES DE LA PUTRÉFACTION
SUR LES PRINCIPALES ALBUMINES

par H. TISSIER.

(Travail du laboratoire du professeur Metchnikoff.)

Nous avons étudié, en 1902 et 1903, avec Martelly et Gasching, la putréfaction spontanée de la viande de boucherie et du lait. Nous avons isolé des produits putrides les mêmes bactéries, et nous avons pu nous rendre compte que la marche de ces fermentations était sensiblement la même; la constitution chimique et physique des milieux causant seule quelques différences.

Il nous a semblé utile de continuer ces recherches en comparant entre eux ces divers microbes protéolytiques. Nous avions bien vu, au cours de ces études, que certaines espèces bactériennes avaient une puissance supérieure à celle des autres, que les variétés anaérobies agissaient plus rapidement sur la molécule albuminoïde; mais nous n'avions pas poussé plus loin nos recherches; nous n'avions pas mesuré cette action.

D'autre part, nous n'avions employé que les albumines des muscles et du lait; il est intéressant de voir si toutes les autres matières protéiques se comportent de même vis-à-vis des diastases microbiennes.

Il importe au biologiste comme au médecin d'être renseigné sur ces faits.

On connaît maintenant, et beaucoup par les travaux de ce laboratoire, toute l'importance de la putréfaction intestinale sur l'évolution de l'organisme humain comme dans la genèse des infections du tube digestif. Nous savons que, chez l'enfant, en réduisant au minimum la fermentation putride des déchets alimentaires, on diminue de beaucoup les chances d'infection intestinale; en augmentant, au contraire, ces fermentations par des régimes surazotés, on décuple ces mêmes chances.

Etablir un régime suffisant, inoffensif, est la grande préoccupation des hygiénistes et des médecins.

Nous avons choisi, pour ces nouvelles expériences, les principaux protéolytiques de la putréfaction spontanée des viandes de boucherie : le *B. Perfringens*, le *B. Putrificus* de Bienstock, le *B. Proteus vulgaris*. Pour être mieux renseignés sur le pouvoir destructif des bacilles putréfiants intestinaux, nous avons pris des échantillons de *B. Perfringens* et de *Proteus* isolés des matières fécales : le premier provenait des selles normales d'un adulte soumis depuis cinq ans au régime végétarien ; le second, des selles d'un enfant atteint de diarrhée chronique. Nous leur avons adjoint deux autres protéolytiques puissants venant du tube digestif humain. Le premier, isolé et étudié par M. Metchnikoff au point de vue morphologique, et par Berthelot au point de vue chimique, le *B. Sporogenes* ; le second, isolé par nous des selles d'un enfant atteint de diarrhée avec coliques violentes et, à cause de ce détail, dénommé *B. Colicogenes*. Voici la description succincte des caractères morphologiques et chimiques de cette dernière espèce :

Bâtonnet rigide à bouts arrondis de la taille du *B. Perfringens*, la plupart du temps isolé, se groupant parfois, dans les cultures jeunes, en courtes chaînettes de 2 à 3 éléments. Il se colore par les colorants basiques ordinaires et par la méthode de Gram. Il ne donne pas, avec l'iode, la réaction de la granulose.

Il est très mobile et donne de petites spores rondes très résistantes. Ces spores prennent naissance dans une extrémité du bacille. Elles se produisent rapidement dans les milieux de culture ordinaire et même dans les milieux sucrés. C'est un anaérobie strict qui ne se développe bien qu'à 37 degrés.

Il donne, dans la gélose sucrée profonde, des colonies lenticulaires très régulières analogues à celles du *B. Perfringens*, n'émettant jamais de prolongements. Rarement, ces colonies présentent une à deux encoches sur le bord tranchant. Au bout de vingt-quatre heures, le milieu est complètement disloqué par les gaz. Il ne pousse que sur la gélatine à 37°. Le milieu est peptonisé et ne se solidifie plus par le refroidissement.

Dans les milieux liquides peptonisés, avec ou sans sucre, il pousse en troublant le milieu. Petit à petit, il se forme au fond du tube un dépôt grumeleux sans caractère spécial. Il s'en dégage, au bout d'un certain temps, une odeur assez particulière rappelant celle du fromage de Gruyère. Le lait est rapidement peptonisé. Il se transforme en un liquide sirupeux jaune clair à la surface duquel nagent un ou plusieurs blocs caséeux.

C'est un ferment très actif des albumines naturelles : blanc d'œuf, fibrine, viande, caséine, gélatine.

Il ne donne, au cours de ces attaques, ni phénol, ni indol; mais une notable quantité d'ammoniaque et d'H^2S.

Il attaque faiblement le glucose et le lactose, nullement le saccharose. Son acidité d'arrêt est de 1,47 p. 1.000 en SO^4H^2. Il est donc capable de détruire, même en milieu sucré, toute espèce d'albumine. La méthode de Duclaux montre qu'au cours de cette attaque des sucres et de la peptone, il donne un mélange d'acide acétique et d'acide valérianique (2 du premier pour 1 du second). Il n'attaque pas l'amidon.

C'est donc un ferment simple comme le *Putrificus,* le *Vibrion septique,* le *B. Sporogenes.*

Il diffère de ces trois espèces par ses caractères morphologiques, biologiques et chimiques. Il n'est pas pathogène pour la souris.

Après avoir rajeuni également les cultures de ces cinq espèces, nous les avons ensemencées dans de grands ballons contenant de l'eau peptonée (peptone Chapoteau = 1 p. 100 d'eau distillée) et un poids donné de matière albuminoïde.

Pour plus de commodité, nous avons pris dans le commerce des matières protéiques désignées : *albumine du sang*, *albumine du jaune d'œuf*, *fibrine sèche*, *albumine végétale*, *fibrine végétale*, *caséine du lait*, *caséine végétale.* Ces deux derniers corps n'ont pas donné de culture appréciable dans une première série d'expériences, à cause de leur acidité. En les neutralisant et en les stérilisant ensuite à 120 degrés, ils subissaient une altération profonde. Nous avons dû les mettre de côté.

Le produit désigné *Albumine du sang* était un mélange d'albumine et de globuline. 18 p. 100 étaient précipitées à 30 degrés par le sulfate de magnésie à saturation. Par la méthode de Kjeldahl, on constatait 11 p. 100 d'azote.

L'*Albumine du jaune d'œuf* avait une constitution analogue, 30 p. 100 étaient précipitées par le sulfate de magnésie à saturation. Elle contenait 12,5 p. 100 d'azote.

Le corps désigné sous le nom d'*Albumine végétale* était de composition plus complexe. 12 p. 100 seulement étaient solubles dans l'eau distillée et avaient les réactions des albumines végétales. 25 p. 100 avaient les réactions des globulines végétales. Les 63 p. 100 restant paraissaient composés d'un mélange de sels acides de globuline, de protean ou d'acidalbumine. Sa teneur en azote était de 12,1 p. 100.

La *Fibrine végétale* provenant de l'usine Schukart, ne correspondait pas à la fibrine du maïs de Ritthausen qu'Osborne range dans le groupe des *prolamines.* C'était un mélange d'une *Gluteline*, d'amidon et de débris de cellulose. Elle ne contenait que 2,7 p. 100 d'azote.

Après avoir fait le vide et les avoir fermés à la lampe, sauf ceux ensemencés avec du *Proteus*, ces ballons étaient mis à l'étuve à 37 degrés pendant un mois. Au bout de ce temps, les cultures étaient filtrées. Le poids du résidu de la culture séché était retranché du poids primitif de la matière en expérience. On connaissait ainsi le poids de l'albumine disparue sous l'action microbienne. A la vérité, il faudrait augmenter légèrement les poids d'albumine ainsi obtenus, le résidu de culture ne doit pas être considéré comme de l'albumine pure, mais comme un mélange de produits de dédoublements insolubles de coloration noirâtre et d'albumine inattaquée. En moyenne, ces résidus culturaux ne contiennent plus que 85 à 90 °/₀ de leur azote primitif.

Nous nous sommes également servis de matières alimentaires riches en azote : *viande dégraissée*, *blanc d'œuf*, *lait*, *fromage de Gruyère*, *lentilles*, *haricots*, *pâtes alimentaires* où les albumines sont à l'état naturel et n'ont pas subi la moindre altération. Pour établir la quantité d'albumine disparue, nous avons dosé l'azote dans ces aliments avant et après la culture. Ces dosages ont été faits par M. F.-P. Garnier.

Voici le résultat de ces expériences :

	B. PUTRIFICUS	B. COLICOGENES	B. SPOROGENES	B. PERFRINGENS	B. PROTEUS vulg.
Albumine du sang .	91	88	86	13	66 »
Fibrine	88	88	88	0	40 »
Alb. de jaune d'œuf.	97	97	98	22	85 »
Albumine végétale .	61	64	72	28	44,5
Fibrine végétale . .	33	40	37	37*	7 »
Viande	82	89	100	Ne pousse pas	18 »
Blanc d'œuf.	100	100	100	Ne pousse pas	2 »
Lait.	93	97	98	72	26 »
Gruyère	88	93	100	Ne pousse pas	60 »
Macaronis ord. . . .	45	62	64	Id.	45 »
Lentilles	33	57	53	Id.	2,80
Haricots blancs . .	44	55	13	Id.	0 »

*) Seul de tous ces microbes, le *B. Perfringens* attaque l'amidon; comme ce produit « fibrine végétale » en contient beaucoup, il est possible qu'une certaine partie de ces 37 p. 100 se rapporte à l'amidon disparu. Ce chiffre ne peut donc pas être comparé à ceux de la même ligne.

(Dans la première partie du tableau, les chiffres indiquent la quantité d'albumine disparue pour 100; dans la seconde partie, la quantité d'azote disparu pour 100.)

Dans les filtrats de toutes ces cultures, nous avons dosé les acides aminés par la méthode de Sœrensen et nous les avons calculés en glycocolle pour 100 de liquide. Le même travail était fait au préalable dans des ballons témoins; le chiffre obtenu était retranché de celui donné par les liquides des cultures.

Pour mieux apprécier l'action de chaque microbe sur les produits secondaires de la dislocation, nous avons rapporté les quantités d'acides aminés à 100 grammes d'albumine disparue dans la première moitié du tableau et à 100 grammes d'azote disparu dans la seconde.

	B. PUTRIFICUS	B. COLICOGENES	B. SPOROGENES	B. PERFRINGENS	B. PROTEUS vulg.
Albumine du sang .	1,6	1,4	1,8	1,60	0,43
Alb. de jaune d'œuf.	1,4	1,3	1,6	2,50	0,34
Albumine végétale .	0,28	0,18	—	0,50	0,55
Fibrine végétale . .	0,39	0,83	1,20	0 »	—
Viande	2 »	1.70	0.69	Ne pousse pas	0.50
Œuf	1.08	1.08	—	Id.	—
Gruyère.	1.70	1,70	—	Id.	—
Macaronis	1 »	0,77	0.62	Id.	-
Lentilles	3.5	4 »	0.90	Id.	—
Haricots blancs. . .	3.8	2.90	—	Id.	—

Comme il est facile de le voir par ces tableaux, les protéolytiques les plus puissants sont des bactéries anaérobies stricts. Ce ne sont pas les seuls, comme le croyait Bienstok; avec Martelly, nous avons vu qu'il y a des aérobies facultatifs capables de jouer le même rôle, mais leur action est loin d'être aussi rapide.

Le *B. Putrificus* et les deux putréfiants intestinaux ont une activité presque égale. Il peut donc se produire des putréfactions tout aussi complètes que celles où domine ce *Putrificus* avec des microbes différents. Les protéolytiques isolés

des matières fécales semblent avoir attaqué les substances alimentaires : viande, œuf, lait, fromage, lentilles, macaronis, haricots, avec plus de facilité que les albumines extraites par des procédés chimiques. Alors qu'ils ont été aussi actifs que le *B. Putrificus* sur ces derniers corps, ils se sont montrés plus puissants sur les autres.

Ces espèces étaient-elles adaptées pour la destruction de ces substances alimentaires aux dépens desquelles elles vivaient? Cette hypothèse est appuyée par ce fait que ces deux putréfiants ont surtout attaqué avec plus d'intensité que le *B. Putrificus* les aliments végétaux, et que tous deux proviennent d'intestins de jeunes enfants au régime lacto-végétarien ou végétarien.

Cette adaptation est encore plus nette pour le *B. Perfringens* dont l'origine est la même ; il attaquait, contrairement aux autres, plus l'albumine végétale que l'albumine du sang ou du jaune d'œuf.

Ces expériences démontrent encore le faible pouvoir protéolytique de cette dernière bactérie, quand elle provient d'un intestin normal tout au moins. En présence d'une matière albuminoïde seule, elle est encore moins active que les bactéries aérobies facultatives. Il n'en est plus de même quand, à côté de cette albumine, il se trouve une matière hydrocarbonée : sucre ou amidon. Sa vitalité s'accroît, son activité diastasique augmente considérablement. Peu actif sur le fromage de Gruyère, par exemple, il détruit les trois quarts de la caséine du lait dans le même temps qu'il met à produire son acidité d'arrêt.

Ceci nous éclaire sur la genèse des troubles gastro-intestinaux constatés chez certains malades soumis à des régimes de pâtes, de purées de féculents plus ou moins mélangées de lait ou d'œuf. Il se produit des ballonnements, des coliques, des selles molles, mousseuses, accompagnées de violentes émissions de gaz qu'un régime uniquement carné ou ovocarné fait cesser. Dans ces cas, la flore microbienne gastro-intestinale contient de nombreux échantillons de *B. Perfringens* dont l'activité se décuple au contact du mélange d'albumine et d'amidon. Quand les déchets digestifs ne contiennent plus que des albumines, la fermentation diminue et change de type. Elle n'est plus aussi gazogène, elle prend le type putride. Les

selles ne sont plus ni molles ni mousseuses; elles deviennent compactes et fétides. Il est bien évident que la cause du mal n'ayant pas disparu, toute reprise d'aliment riche en amidon fait reparaître ces troubles.

On voit encore, en consultant ces tableaux, que le *Proteus* dont nous nous sommes servis avait un pouvoir protéolytique égal aux deux tiers environ de celui des trois premiers anaérobies stricts. Par contre, s'il attaque moins la molécule albuminoïde, il pousse plus loin la dislocation et la destruction des produits secondaires. Contrairement à ce qui se passait pour les autres microbes en expérience, les produits de culture ne donnaient jamais la réaction du biuret; la quantité des acides aminés restants était toujours inférieure à celle des autres, sauf pour l'albumine végétale; la quantité d'ammoniaque, toujours supérieure.

Dans toutes ces expériences, les albumines sont loin d'avoir résisté de même façon aux diastases microbiennes. Elles se sont montrées friables dans l'ordre suivant : tout d'abord, le blanc d'œuf, puis, en ordre décroissant, les albumines du jaune, celles du lait, du fromage, de la viande, de la fibrine; puis, en dernier lieu, les albumines végétales, d'abord celles des farines de céréales ou des pâtes alimentaires, et enfin celles des graines de légumineuses. Ces dernières ont résisté deux fois plus que les albumines animales. Elles ont donné, pour un même poids d'albumine détruit, une quantité double d'acides aminés, alors que les protéines des graines de céréales n'en donnaient pas plus que leurs similaires d'origine animale. Est-ce dû à une résistance plus grande des produits de cette dislocation moléculaire, ou plus simplement à une plus forte proportion de nucléo-albumines?

Il est intéressant de rapprocher de ces chiffres ceux donnés par Atwater concernant l'utilisation des aliments chez l'homme. Les diastases digestives détruisent 97 p. 100 des albumines animales; 85 p. 100 de celles des céréales; 78 p. 100 de celles des légumineuses. En moyenne, 85 p. 100 des albumines végétales est assimilé. Nos expériences avec F.-P. Garnier donnent un chiffre moins fort, 77 p. 100. Les diastases microbiennes sont donc tout aussi actives sur les protéines animales, mais bien moins que les digestives sur les albumines végétales. Le

médecin ou l'hygiéniste qui voudra établir des régimes alimentaires ne devra pas perdre de vue que si les protéines végétales sont moins digestibles, elles sont aussi deux fois moins putrescibles, ce qui a bien son importance.

Nous avons recherché l'indol et les phénols dans tous les produits de culture. Mais de toutes ces bactéries putréfiantes, seuls le *B. Proteus* donne de l'indol et le *B. Perfringens* de l'indol et des phénols. Cette dernière bactérie n'en donne que peu et la race de *proteus* choisi n'en donnait presque pas dans les milieux ordinaires. Elles se sont comportées de même façon dans les milieux en expérience.

Enfin, nous avons voulu voir si ces diverses bactéries étaient susceptibles de donner, avec un ou plusieurs aliments, des substances particulièrement toxiques. Nous avons filtré à la bougie Berckfeld les produits de ces cultures, et nous les avons inoculés à des souris à la dose de 0 c.c. 5. Les animaux ne semblent en avoir ressenti aucun trouble.

Comme nous l'avons établi avec Gasching en 1903, ces produits de la putréfaction habituelle ne sont pas toxiques pour l'homme à faible dose ou mélangés aux aliments. Il n'en serait peut-être pas de même si ces expériences étaient répétées tous les jours. La clinique montre bien le mauvais effet des putréfactions intestinales, soit par la résorption quotidienne des produits putrides, soit par l'appoint qu'elles fournissent au développement des espèces pathogènes. Il faut espérer que les recherches entreprises dans ce laboratoire par M. Metchnikoff et ses élèves résoudront cet important problème.

ÉTUDES SUR LE PNEUMOCOQUE

X. — VIRULENCE DES PNEUMOCOQUES, HUMAINS ET ANIMAUX, POUR LE LAPIN ET LE COBAYE

par Ch. TRUCHE et L. COTONI.

La majorité des auteurs semble admettre implicitement que le pneumocoque (*humain*, seul mentionné jusqu'ici dans les travaux bactériologiques) se montre volontiers pathogène pour le *lapin*, mais il n'existe aucune étude systématique sur le sujet. La virulence vis-à-vis du *cobaye* est encore plus mal connue. Nous nous sommes proposé d'élucider ces deux points, en utilisant, au fur et à mesure de leur isolement, les nombreux échantillons de pneumocoques *humains et animaux* que nous possédons et dont l'origine se trouve indiquée, en grande partie, dans nos publications antérieures. [Les germes humains, isolés depuis, provenaient soit de crachats pneumoniques, soit de pus oculaire, pleural, méningé, périnéphrétique, urinaire et sous-cutané — un nouveau germe du lapin (n° 299) a été extrait du sang d'un animal qui avait reçu, par la voie intraveineuse, des bacilles de Shiga tués à l'alcool-éther.]

Pour ce qui concerne la *technique* suivie, nous renvoyons à ces *Annales* (juin 1911).

Virulence pour le lapin.

Aucun pneumocoque, inoffensif vis-à-vis des souris — à la dose de 1 centimètre cube de culture en milieu T (vingt-quatre heures) dans les muscles — n'a tué les lapins (animaux de 2.000 grammes, en moyenne) dans les mêmes conditions expérimentales. Parmi les échantillons plus ou moins actifs sur la souris, la *minorité*, seulement, amenait la mort des lapins. Voici la liste des *onze* pneumocoques qui constituent cette minorité. Nous y avons adjoint l'échantillon A, dont il a été question dans nos recherches antérieures; il n'était mortel (et encore, à l'origine)

que sous le volume de 2 centimètres cubes, administrés par la voie intra-pleurale.

Il convient de noter que les chiffres du *tableau* suivant indiquent uniquement la « *virulence au départ* » (première culture en milieu T).

SIGNALEMENT de l'échantillon.	ORIGINE	DOSE MORTELLE pour le lapin, dans les muscles.	DOSE MORTELLE pour la souris, dans les muscles.
286	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	10^{-7} c. cube. (1)	10^{-11} c. cube.
306	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	10^{-7} c. cube.	10^{-10} c. cube.
299	Sang de lapin (ayant reçu des bacilles de Shiga, tués par l'alcool-éther, dans les veines).	10^{-6} c. cube.	10^{-6} c. cube.
Alleaux.	Sang de lapin (ayant reçu des bacilles de Schmorl).	10^{-1} c. cube.	1 c. cube.
Cesari.	Sang de lapin (ayant reçu des bacilles de Schmorl).	10^{-1} c. cube.	1 c. cube.
H.	Crachat pneumonique. Pneumonie ayant guéri [Echantillon Aynaud. Ces *Annales*, 1911, p. 485].	1 c. cube.	10^{-10} c. cube.
287	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	1 c. cube.	10^{-10} c. cube.
Jouan.	Sang de lapin (ayant reçu des bacilles charbonneux).	1 c. cube.	10^{-3} c. cube.
Merlier.	Pus de malade atteint de panophtalmie. [Service du Dr Morax.]	1 c. cube.	10^{-2} c. cube.
199	Sang de malade atteint de pneumonie, puis de méningite. Cas mortel.	1 c. cube.	10^{-2} c. cube.
Hôpital de la Pitié.	Crachat pneumonique. Pneumonie ayant guéri.	1 c. cube.	10^{-1} c. cube.
A.	Crachat pneumonique. Pneumonie ayant guéri. [Ces *Annales*, 1911, p. 486.]	2 c. cubes. (Ici, *dans la plèvre*.)	1 c. cube.

(1) 10^{-7} c. cube $= \frac{1}{10^{7}}$ c. cube $= \frac{1}{10.000.000}$ c. cube.

Les pneumocoques, virulents pour le lapin, semblent donc rares chez l'homme et fréquents chez le lapin. Dans un mémoire

précédent (ces *Annales*, janvier 1912), M. Grenier a fait voir comment s'effectue la « sortie » des pneumocoques quand on injecte, à des animaux sains (réellement ou en apparence), diverses bactéries et toxines. Il est curieux de constater que « les pneumocoques de sortie » se sont toujours montrés virulents pour le lapin quand ils provenaient du lapin et constamment avirulents pour le cobaye (et le lapin) quand ils provenaient du cobaye.

L'activité (au regard du lapin) de nos échantillons isolés de l'homme et du lapin a toujours fléchi très vite; la première culture (culture obtenue avec le cerveau du premier lapin) était déjà devenue offensive, ou ne tuait que sous le volume de 1 centimètre cube. *Elle avait*, cependant, *conservé sa virulence initiale* (parfois maxima) *vis-à-vis de la souris*. On a vu d'autre part, dans un travail antérieur, que les pneumocoques, actifs sur les souris, gardent cette activité au moins pendant quelques passages s'ils sont peu pathogènes et indéfiniment quand ils le sont beaucoup. La virulence pour le lapin se révèle donc des plus fragiles, contrairement à la virulence pour la souris, *fait aussi curieux qu'inattendu*.

Si, malgré des isolements très nombreux et une technique nouvelle donnant des garanties supérieures à celles des méthodes anciennes (voir notre second mémoire), nous n'avons jamais pu obtenir des pneumocoques doués d'une virulence *à la fois marquée et stable* pour le lapin, d'autres chercheurs ont été plus heureux, comme le montrent les trois exemples suivants dus, les deux premiers à l'obligeance de M. M. Nicolle, le troisième à celle de M. E. Sergent (les doses indiquées se rapportent à des cultures de vingt-quatre heures en bouillon-ascite).

I. — Pneumocoque isolé à Constantinople, en 1895, d'une angine bénigne chez une fillette. Tuait le lapin à 10^{-4} centimètres cubes (au moins), sous la peau. S'est maintenu virulent six ans (abandonné ensuite).

II. — Pneumocoque isolé à Constantinople, en 1898 (conjointement avec le bacille de Löffler), du sang du cœur d'un enfant mort de diphtérie. Tuait le lapin à 10^{-6} centimètres cubes, sous la peau. S'est maintenu virulent trois ans (abandonné ensuite).

III. — Pneumocoque isolé à Paris, en 1900, d'un crachat pneumonique. Tuait le lapin à 10^{-5} centimètres cubes sous la peau. S'est maintenu virulent dix ans (abandonné ensuite). Nous le ferons connaître, en détail, dans un mémoire ultérieur.

Les « pneumocoques M. Nicolle » et le « pneumocoque Sergent » n'ont été l'objet d'*aucun soin spécial*, lors de leur isolement et des passages par les lapins. Ceux qui les ont étudiés nous ont affirmé qu'avec nos procédés actuels de travail il nous aurait été extrêmement facile de conserver l'activité de tels germes si nous avions eu la chance d'en rencontrer. Nous sommes donc fondés à les considérer comme vraiment rares. — Notons que l'*inoculation directe* des produits humains ou animaux au lapin et les *passages directs* par lapin (avec le cerveau des sujets infectés) ont donné des résultats encore plus mauvais que notre technique habituelle.

Virulence pour le cobaye.

Aucun pneumocoque, inoffensif pour les souris et les lapins, ne fait périr les cobayes (animaux de 400 grammes en moyenne), à la dose de 1 centimètre cube de culture dans les muscles. Parmi les échantillons plus ou moins actifs vis-à-vis des souris et des lapins, il est exceptionnel d'en rencontrer qui tuent les cobayes dans les conditions indiquées. Avec des doses notables (par exemple, 4 centimètres cubes) ou bien en employant des modes d'inoculation sévères (voies intrapleurale, intrapéritonéale, intrapulmonaire, intratesticulaire, intraveineuse), on accroît artificiellement le nombre des échantillons actifs, mais fort peu.

Nous indiquons parallèlement, dans le *tableau* suivant, la « *virulence au départ* » pour le cobaye, le lapin et la souris, de cinq échantillons d'origine humaine.

On a déjà mentionné que les pneumocoques, isolés des cobayes (« pneumocoques de sortie », pour la plupart), se sont toujours révélés inactifs vis-à-vis des cobayes (1) et des lapins; rappelons que leur virulence au regard de la souris demeurait également faible, parfois nulle.

Somme toute, le pneumocoque, quelle qu'en soit l'origine, est rarement pathogène pour le cobaye et, dans les cas positifs, ne manifeste qu'une activité médiocre. Comment concilier ce

(1) Le Dr Girard a cependant rencontré jadis, chez des cobayes, quelques échantillons virulents pour cette même espèce. Il s'agit certainement là de cas exceptionnels; d'autant plus intéressants, d'ailleurs.

fait avec la banalité des infections pneumococciques chez les cobayes (voir le travail de M. Grenier — ces *Annales*, janvier 1912)?

SIGNALEMENT de l'échantillon.	ORIGINE	DOSE MORTELLE pour le cobaye, dans les muscles.	DOSE MORTELLE pour le lapin, dans les muscles.	DOSE MORTELLE pour la souris, dans les muscles.
286	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	1 c. cube.	10^{-7} c. cube.	10^{-11} c. cube.
306	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	1 c. cube.	10^{-7} c. cube.	10^{-10} c. cube.
II.	Crachat pneumonique. Pneumonie ayant guéri.	4 c. cubes.	1 c. cube.	10^{-10} c. cube.
287	Crachat pneumonique. Pneumonie mortelle.	L'animal résiste à 1 c. cube.	1 c. cube.	10^{-10} c. cube.
292	Crachat pneumonique. Pneumonie ayant guéri.	L'animal résiste à 1 c. cube	L'animal résiste à 1 c. cube (*même dans la veine*).	10^{-10} c. cube.

Très facilement. Ainsi que nous l'avons dit dans notre premier mémoire, ce que nous présente l'examen clinique, c'est *uniquement* l'image d'une infection plus ou moins sévère, où l'intensité des phénomènes observés se trouve directement liée à la virulence de l'agent pathogène et inversement à la résistance du sujet atteint. Dans le cas, *habituel ici*, des « pneumocoques de sortie », l'état de débilitation antérieure de l'organisme permet à des germes, inoffensifs pour les cobayes normaux, de végéter sans peine *in vivo* et de déterminer des accidents toujours graves, souvent mortels.

Conclusions.

1. Les pneumocoques humains se montrent rarement virulents pour le lapin, exceptionnellement très virulents.

2. Les pneumocoques du lapin (« pneumocoques de sortie ») paraissent, dans la règle, virulents pour le lapin.

3. Vis-à-vis du lapin, la virulence des pneumocoques de

l'homme ou du lapin fléchit très rapidement; rien de semblable ne s'observe vis-à-vis de la souris.

4. Les pneumocoques très actifs pour le lapin sont toujours très actifs pour la souris; les pneumocoques peu actifs pour le lapin offrent, au regard de la souris, une activité variable.

5. Les pneumocoques très actifs pour la souris peuvent être peu actifs pour le lapin; les pneumocoques moyennement ou peu actifs pour la souris sont généralement inactifs pour le lapin.

6. Les pneumocoques humains se montrent exceptionnellement virulents pour le cobaye et cette virulence reste toujours faible.

7. Les pneumocoques du cobaye (« pneumocoques de sortie ») paraissent, dans la règle, avirulents pour le cobaye.

8. Les pneumocoques actifs pour le cobaye sont toujours très actifs pour la souris et toujours actifs pour le lapin; *la réciproque n'est point vraie.*

Nous avons dit, dans notre premier mémoire, qu'il était impossible de conclure *rigoureusement* de la virulence pour la souris à la virulence pour l'homme et nous maintenons ferme notre opinion. On ne nous accusera pas, espérons-le, d'être en contradiction avec nous-mêmes si nous faisons observer qu'une forte virulence pour la souris, jointe surtout à une virulence évidente (et, *a fortiori*, marquée) pour le lapin, constitue néanmoins une *sérieuse présomption* en faveur d'une activité notable au regard de l'organisme humain — et une *quasi-certitude*, quand il s'agit de malades sans tares ni infections antérieures.

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES « MICROBES SPIRALÉS DE LA BOUCHE »

CULTURE, ISOLEMENT ET ÉTUDE DE QUELQUES TYPES

par G. REPACI

(Travail du laboratoire de M. le Dr Veillon, à l'Institut Pasteur.)

L'étude des microorganismes spiralés de la bouche est depuis un certain temps poursuivie très activement.

Leur importance au point de vue étiologique, dans la stomatite ulcéreuse, fut envisagée à partir du moment où Pasteur le premier les signala dans le liquide salivaire pris sur un enfant atteint de cette maladie. Bergeron, Netter les étudièrent plus tard et cherchèrent à reproduire la lésion chez les animaux. Vincent montra l'association presque constante d'un spirochète au bacille fusiforme dans l'angine et la stomatite ulcéro-membraneuse.

D'autre part, des spirilles ont été vus dans de nombreuses affections de la bouche, telles que le noma, les abcès péri-dentaires, la carie dentaire. Neisser, Baermann et Halberstädter (1) les constatèrent dans une stomatite ulcéreuse d'un orang-outang ; Veillon et Guillemot (2), dans la gangrène pulmonaire et dans la pleurésie putride ; Bertarelli, Volpino et Bovero (3), dans les crachats d'un cardiaque.

Malgré toutes ces constatations, à l'heure actuelle, on est bien loin d'être fixé, d'une façon exacte, sur leur rôle pathogène.

Etant donné qu'on les constate d'une façon banale dans les affections les plus diverses, on est en droit de se demander s'il ne s'agit pas de microorganismes qui pullulent sur les tissus morts; si on n'a pas affaire, en d'autres termes, à de simples saprophytes.

(1) Neisser, Baermann et Halberstädter, *La syphilis*, I-IV, 1906.

(2) Guillemot, Recherches sur la gangrène pulmonaire. *Thèse de Paris*, 1898.

(3) Bertarelli, Volpino et Bovero, *R. Acc. di medicina di Torino*, 1905.

La difficulté de pouvoir élucider cette question tenait en grande partie au fait qu'on n'avait pu réussir à isoler et à cultiver ces microbes.

En effet, les tentatives de culture de spirilles faites soit avec les pathogènes, soit avec les saprophytes, avaient ou échoué complètement, ou donné des résultats peu satisfaisants jusqu'aux recherches de Mühlens et Hartmann (1) qui, les premiers, annoncèrent avoir isolé et cultivé purement un spirochète de la bouche.

Ces auteurs réussirent à isoler et à cultiver, pendant cinq mois de suite, *Spirochete dentium*, en employant la méthode de culture de Veillon, mais substituant à la gélose sucrée de cet auteur le milieu conseillé par Ellermann pour la culture du b. fusiforme.

Ils procédèrent de la façon suivante : avec de la gélose neutre ou légèrement alcaline, ils remplissent à moitié des tubes à essai qu'on maintient pendant une demi-heure à 100 degrés dans un bain-marie. Du sérum de cheval est chauffé une demi-heure à 60 degrés. Après avoir refroidi à 45 degrés la gélose et le sérum, on ajoute dans les tubes à essai un tiers de sérum. On ensemence et on refroidit brusquement.

Technique.

Dans les recherches que nous poursuivons depuis longtemps sur la flore bactérienne anaérobie de la bouche de l'homme, nous avons toujours employé la méthode classique de notre maître Veillon. C'est grâce à cette méthode, qui est d'une simplicité extrême, que nous avons isolé et cultivé plusieurs types de spirilles de la bouche.

La méthode conseillée par Schereschewscki (2) pour la culture du sp. pallida ne pouvait nous servir, car il est impossible, par ce procédé, d'obtenir des cultures pures.

Il faut, en effet, penser que les spirochètes provenant soit du tartre dentaire, soit du matériel pathologique varié qui en contient, sont toujours mélangés avec de très nombreuses espèces.

(1) Muhlens et Hartmann, *Zeits. für Hygiene*, vol. LV, 1906.
(2) Schereschewscki, *Deuts. med. Woch.*, 1909.

Or, pour obtenir des colonies suffisamment séparées de façon à pouvoir aisément les isoler, il est absolument indispensable ou d'avoir un milieu dans lequel ne poussent que les seuls spirochètes, ce qui n'est pas le cas du milieu de Scheresschewski, ou un milieu qui, n'empêchant pas les autres bactéries, permet aux spirochètes de se développer. Il est certain que quand il s'agit des microbes anaérobies stricts — et comme on va le voir, les spirochètes de la bouche sont précisément des anaérobies stricts — la meilleure technique est celle de Veillon. Le milieu est extrêmement clair et permet d'apercevoir les plus petites colonies : en outre, il est convenable, comme nos cultures le démontrent, pour le développement des microorganismes en question. Il ne nous a pas semblé indispensable d'ajouter du sérum à la gélose sucrée, comme le conseillent Ellermann (1), Mühlens et Hartmann, car cette opération nous semble tout à fait superflue, les spirochètes poussant bien dans l'un comme dans l'autre milieu. De même, nous ne croyons pas qu'il y a intérêt à employer la gélose simple au lieu de la gélose sucrée, dans les tubes de Veillon, car la gélose sucrée donne une anaérobiose plus rigoureuse et plus stable que la gélose simple.

Pour obtenir la culture des spirochètes, il est nécessaire de faire des dilutions très soigneuses, après avoir dissocié dans le premier tube le tartre dentaire ou le matériel pathologique, *minutieusement*. Voici comment nous procédons : après avoir fait ce que nous venons de dire, nous plaçons pendant quelques minutes le tube dans l'eau chaude, à 37 degrés environ. Les gros paquets de tartre dentaire. insuffisamment dissociés, tombent au fond ; les spirochètes libérés par la dissociation des autres microbes étant très mobiles, nagent dans la partie supérieure du liquide. C'est de cette partie que nous prélevons le liquide à ensemencer dans les autres tubes, par le procédé des dilutions successives. Nous ensemençons une quinzaine de tubes en moyenne. Nous n'insistons pas sur ces détails, car le procédé est classique et très connu.

Il arrive souvent que, malgré toutes les précautions, on n'arrive pas à isoler de spirochètes.

Cela tient probablement à la composition de la gélose sucrée. Malgré tous les soins qu'on y met, il est presque impossible d'obtenir toujours une gélose identique. Souvent, dans un milieu qui a toutes les bonnes apparence usuelles, les résultats sont complètement nuls. Heureusement, en règle générale, on arrive presque toujours à isoler les spirochètes. La plus grande

(1) Ellermann (V.), Ueber die Cultur der fusiformen bacillus. *Centralb. für Bakt.*, Bd XXXVII.

difficulté est dans la variabilité de l'aspect des colonies qui n'ont pas de caractères fixes et bien tranchés et souvent ressemblent aux colonies les plus banales. Cela impose la nécessité absolue d'isoler et d'examiner toutes les colonies, sans exception.

Une autre raison qui rend précaire la connaissance des caractères soit macroscopiques, soit microscopiques, des colonies de ces microbes, est ce fait, absolument certain, que leurs caractères varient avec les qualités mêmes de la gélose sucrée employée. De petites colonies à peine visibles deviennent plus grosses, et, ce qui est plus intéressant, changent du tout au tout, quand on passe par exemple d'une gélose plus épaisse à une autre moins dense.

La peptone qu'on emploie, le temps pendant lequel la viande a macéré avant de faire le bouillon, la viande même qu'on a à sa disposition, les différents chauffages peuvent, jusqu'à un certain point, être des coefficients utiles ou nuisibles pour le développement de ces microbes, qui sont très délicats et fragiles. Cela revient à dire qu'il est absolument nécessaire, si l'on veut isoler ces microbes, de s'en tenir scrupuleusement aux détails de la technique pour la préparation de ce milieu.

Résultats obtenus.

Parmi les spirochètes que nous avons isolés, les trois premiers que nous allons décrire semblent des espèces distinctes, mais peuvent être rangés dans un même groupe par leurs caractères généraux.

Nous ferons une place à part au quatrième, qui présente des caractères bien particuliers.

Spirochète A (1). — Il est anaérobie strict. Il pousse, lors du premier ensemencement, vers le huitième jour, mais dans les repiquages ultérieurs, il se développe plus vite, dans un délai de quatre ou cinq jours environ. Les colonies se présentent sous la forme de petits points translucides, ressemblant à des gouttelettes de rosée, très difficiles à apercevoir si l'on n'a pas soin de regarder les tubes à l'aide d'une lumière très intense. Au contraire, quand le microbe s'est suffisamment habitué à nos milieux artificiels, les colonies deviennent plus apparentes et peuvent atteindre, si elles sont suffisamment espacées, un diamètre d'environ un demi à 2 millimètres. Alors elles sont discoïdes, à bords tranchants, luisantes, le centre de la colonie est de teinte saumonée.

(1) Repaci, Isolement et culture d'un spirochète de la bouche. *Comptes rendus de la Soc. de Biol.*, 30 mai 1910.

La température optima est de 37 degrés, ce microbe ne pousse pas à la température ordinaire. Il ne produit pas de gaz, les cultures répandent une faible odeur acétique qui disparaît très vite.

Il pousse faiblement dans les milieux liquides. Le bouillon reste clair, mais, en l'agitant, on voit des ondes soyeuses ; au bout d'une vingtaine de jours, un faible dépôt se forme au fond des tubes.

Notre microbe n'utilise sensiblement pas le glucose, ni le saccharose, ni la dextrine, mais il semble attaquer légèrement le lactose. Le lait est acidifié très lentement, mais il n'est pas coagulé. Le blanc d'œuf cuit ne subit pas d'attaque.

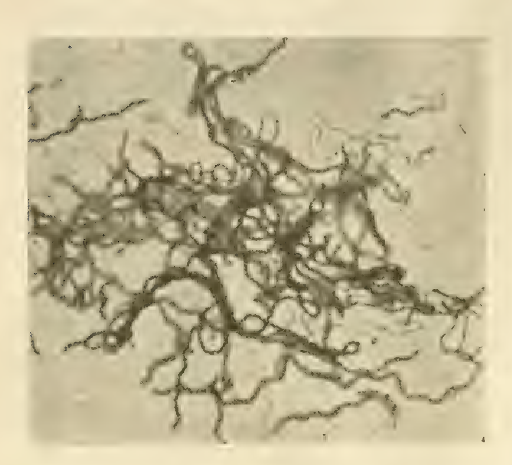


Fig. 1. — Spirochète A. Culture de 5 jours. Gross., 1.800 D.

La vitalité du microbe à l'étuve, en tubes capuchonnés, est d'une vingtaine de jours.

L'étude en goutte pendante, avec l'objectif à immersion et sans éclairage spécial, montre des amas de spirochètes enchevêtrés, agglutinés entre eux, très réfringents. C'est en observant les individus libres qui se trouvent souvent à la périphérie des amas, ou en dissociant les amas, que l'on peut étudier les mouvements singuliers de ce microbe.

On constate d'abord que le microorganisme se comporte comme un véritable ressort spiralé, les tours de spires se rapprochant ou s'éloignant alternativement les uns des autres ; en même temps, la spirale peut subir des torsions latérales dans tous les sens, ce qui montre sa grande flexibilité.

Notre microbe offre deux types principaux de mouvements : des mouvements latéraux, qui se font sur place, par une sorte d'oscillation pendulaire extrêmement rapide, et des mouvements de translation, qui s'opèrent par rotation autour de l'axe longi-

tudinal. Ces derniers — véritables mouvements de vrille — ont lieu soit en avant, soit en arrière, avec une rapidité et une brusquerie remarquables, le microorganisme passant par saccades de l'état de repos à l'état de mouvement.

Le nombre des spires, lesquelles sont préformées et ne disparaissent pas à l'état de repos, est très variable. A côté des éléments très courts, qui ont l'aspect d'un vibrion ou d'un *S* italique, on voit des éléments qui peuvent varier de deux tours de spire complets à une vingtaine et plus.

On conçoit donc qu'il est bien difficile de pouvoir déterminer avec exactitude les dimensions longitudinales du microorganisme. Elles varient selon le nombre de spires dont chaque élément est pourvu. Plus facile à déterminer est son épaisseur, qui est presque toujours égale : 2/3 de μ à 1 μ environ.

Les caractères des tours de spires sont tout à fait spéciaux. L'examen à l'état vivant montre que le corps microbien ne se trouve pas tout entier sur le même plan : on a donc affaire à une spirale complète, comme celle d'une vis. Les spires sont régulières et parallèles et forment une spirale complète. La profondeur de la spire est d'environ 1 μ, la longueur de 1 à 2 μ. Si l'on veut bien comparer ces dimensions avec celles données par Mühlens et Hartmann pour *Sp. dentium*, on conçoit la très grande différence d'aspect qu'il y a entre notre spirochète et *Spirochete dentium*.

Dans les cultures âgées d'une dizaine de jours, on peut remarquer des éléments microbiens extrêmement développés. Ils sont très longs, enroulés sur eux-mêmes, entortillés dans tous les sens et donnent l'impression de ficelles jetées à terre au hasard; d'autres ont tout à fait l'apparence d'une natte de cheveux. On pourrait penser, au premier abord, à une division longitudinale du microorganisme; il n'en n'est rien : on voit que c'est un élément qui s'est enroulé sur lui-même très exactement, ou deux éléments accolés l'un à l'autre.

Ce spirochète se colore facilement et uniformément et presque instantanément par tous les colorants ordinaires. Il ne prend pas le Gram. Nous n'avons jamais observé, dans les cultures jeunes, ni espaces clairs ni points plus intensément colorés. Les contours sont très nets, le corps microbien cylindrique. Traité par le Giemsa, il prend une coloration bleuâtre.

Par la méthode de Lœffler, modifiée par Nicolle et Morax, nous avons constaté que ce spirochète est pourvu de cils. Les formes courbes possèdent un ou deux cils. S'il est unique, le cil prend naissance à une des extrémités ou au milieu du corps, en s'implantant du côté de la concavité. Quand il y en a deux, ils prennent naissance aux deux extrémités en formant comme des prolongements du corps, ou bien tous les deux à la même extrémité, ou un à une extrémité et l'autre au milieu du corps.

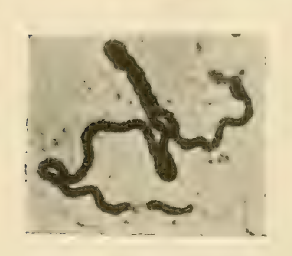


Fig. 2. — Spirochète A. Forme en natte de cheveux. — Col. par la méthode Lœffler, Nicolle-Morax. Gross., 1.800 D.

Dans les formes à plusieurs tours de spires, les cils sont plus nombreux et sont implantés le long du corps d'un côté et de l'autre à intervalles variables.

C'est la même disposition péritriche que M. Borrel (1) a décrite chez *Sp. Gallinarum* et *Zettnow* (2) chez *Sp. Duttoni*. Ces cils dépassent la longueur du corps microbien, lorsqu'il s'agit des formes vibrioniennes, ils sont très flexueux, très minces. Ils ne sont pas visibles par la coloration au Giemsa ni par aucune coloration simple.

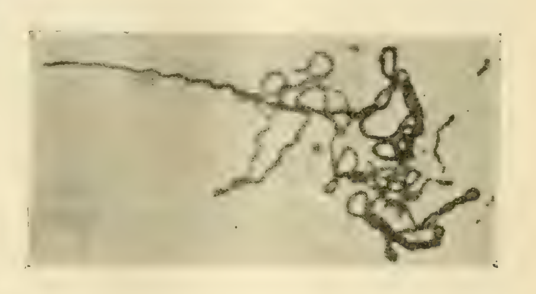


Fig. 3. — Spirochète A. Forme géante, en ficelle. — Gross., 1.800 D.

Les extrémités du spirochète en question sont arrondies. Dans quelques éléments on peut observer aussi qu'elles se terminent comme un crochet.

Nous n'avons décelé aucune ébauche de membrane ondulante, ni rien qui paraisse s'en rapprocher, ni par la coloration au Lœffler, ni par l'hématoxyline ferrique, en faisant nos pré-

(1) Borrel, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LX, 1906.
(2) Zettnow, *Zeits. für Hygiene*, 1906, t. LII.

parations soit avec du matériel jeune, soit avec des cultures anciennes, sur lesquelles nous avons fait agir l'eau distillée ou le taurocholate de soude.

L'examen de notre spirochète, en vue d'étudier le mode de division, a été fait sur des lames colorées par des procédés divers et en nous servant de cultures d'âges différents. Etant donnée la grande importance qu'on attache à certaines formes pour démontrer la division longitudinale de ces êtres, nous les avons cherchées de la façon la plus scrupuleuse. Il est certain, en effet, qu'il existe des formes qui prennent l'aspect d'un Y



Fig. 4. — Spirochète A. Forme en Y, avec cils. — Col. par la méthode Lœffler, Nicolle-Morax. Gross., 1.800 D.

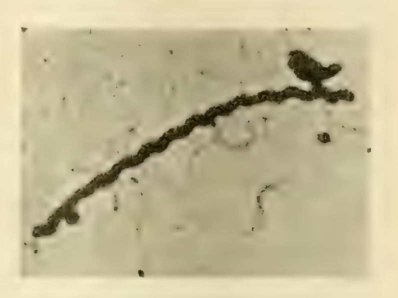


Fig. 5. — Spirochète A. Cils péritriches. — Col. par la méthode Lœffler, Nicolle-Morax. Gross., 1.800 D.

ou d'un V. Mais nous ne partageons pas l'avis des observateurs très nombreux qui les considèrent comme des stades d'une segmentation longitudinale.

Avant tout, il nous semble utile d'établir que nous n'avons jamais vu ces formes dans les éléments courts. Au contraire, elles peuvent se voir dans les éléments longs. Mais il s'agit de différents aspects donnés par l'enroulement sur elles-mêmes des formes longues. Un spirochète à plusieurs tours de spires, qui se fléchit à son milieu, les deux moitiés s'accolant sur un certain nombre de spires, tandis que les deux extrémités restent libres, peut donner très bien l'apparence d'un Y. Admettons au contraire qu'au lieu de s'accoler, les deux moitiés restent écartées, elles peuvent donner au spirochète l'aspect en V. Il faut avouer d'autre part que les dessins donnés par les différents auteurs qui ont observé ces formes en Y et

en V ne correspondent pas aux formes observées par nous.

Les formes en V et en Y que nous avons vues sont sûrement (et il est très aisé de le voir) les différents aspects de l'enroulement du microbe sur lui-même.

Plus troublantes, au contraire, peuvent être les figures données par deux spirochètes, l'un long, l'autre court, l'extrémité de ce dernier étant réunie au corps de l'autre. Nous avons vu quelque chose de semblable dans nos préparations, qui pouvait donner l'impression d'un Y ou d'un V véritable. Mais au point de vue de leur interprétation, nous nous rallions à l'opinion déjà émise par Levaditi (1), qui considère ces dispositions comme les résultats de la réunion de deux individus par suite de l'accolement de leurs prolongements ciliaires, ou d'un point du corps microbien.

Au contraire, nous avons vu des spirochètes qui montraient, d'une façon tout à fait nette, la division transversale. Un point du corps microbien devient plus clair d'abord, puis s'étrangle et se divise complètement. On peut voir, dans ces différents stades, les individus fils réunis encore par un trait de substance très court, très mince et très pâle, ou bout à bout, déjà complètement séparés. Ce mode de division transversale a été déjà vu d'une façon indiscutable par Borrel (2), Swellengrebel (3), Borrel et Cernovodeano (4) chez *Sp. Balbianii*, *Spirillum Giganteum* et *Sp. Gallinarum*; par Levaditi (5) chez *sp. Gallinarum* et le *sp.* de la *Tick-Fever*; par Zettnow chez le spirochète de la bouche et le *spirille* de la *Tick-Fever*.

Ce microorganisme n'a aucune action pathogène sur les animaux de laboratoire.

Spirochète B. — Ce microorganisme est anaérobie strict. Dans les tubes d'isolement il pousse après trois jours, sous la forme d'une colonie discoïde, à bords nets, régulière, luisante et transparente, blanchâtre à la périphérie, jaunâtre au centre, d'un diamètre d'un millimètre au plus. Cet aspect, qui apparaît

(1) Levaditi et Roché, *La syphilis*, 1909.

(2) Borrel, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LX, 1906.

(3) Swellengrebel, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, t. LXII; *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1907.

(4) Borrel et Cernovodeano, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1907, t. LXII.

(5) Levaditi, *Loco citato*.

tel que nous venons de le décrire, dans la gélose sucrée ordinaire, change profondément si on ajoute au milieu un tiers de sérum de cheval, chauffé une demi-heure à 55 degrés. Dans ce cas les colonies deviennent rondes, volumineuses, et prennent l'aspect de petites boules de diamètres variables entre 2 à 4 millimètres. Elles sont blanches, nuageuses et montrent à la périphérie une efflorescence de très fins et courts prolongements très délicats.

On pourrait donc penser que ce microbe aime le milieu au sérum.

Les nombreuses expériences que nous avons faites à ce sujet nous ont montré, au contraire, que les colonies prennent cet aspect, qui témoigne d'une végétabilité plus active, aussi bien dans la gélose ordinaire sucrée, quand on a eu soin de mettre une proportion moindre d'agar (7 p. 1.000).

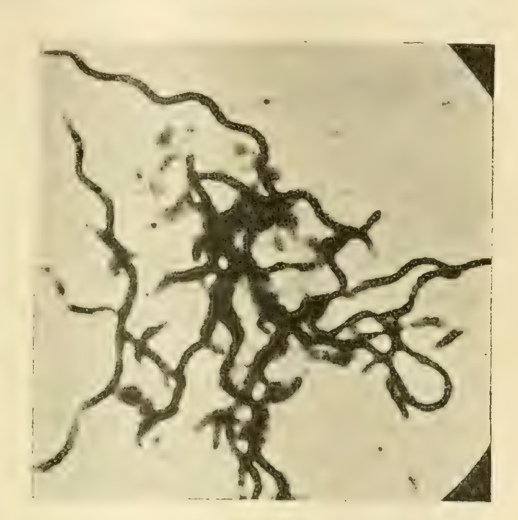


Fig. 6. — Spirochète B. On remarquera que le corps microbien n'est pas teint d'une façon uniforme. — Col. par le Giemsa. Gross., 1.800 D.

Il semblerait donc que le sérum ajouté n'agit qu'en diminuant la densité de la gélose.

Au contraire, dans le bouillon sucré et dans le milieu bouillon pomme de terre, il ne cultive presque pas. On ne voit, après plusieurs jours, que quelques maigres flocons qui tombent au fond des tubes et l'on serait bien embarrassé de pouvoir affirmer que cela ne soit pas la semence qu'on a mise.

La température optima de développement est de 37 degrés à l'étuve, pendant quarante-huit heures. Il ne se développe pas à la température ordinaire.

Sa vitalité dans les tubes gardés à l'étuve est de cinq à six jours, mais il est utile de repiquer la culture tous les quatre jours, car, passé ce délai, il arrive souvent que le microbe soit

déjà mort. Quand les colonies sont suffisamment développées, on peut les garder un peu plus longtemps vivantes à la température ordinaire.

Examiné en goutte pendante, ce microbe se présente sous l'aspect polymorphe de bâtonnets incurvés à la façon d'un vibrion, ou de bâtonnets avec une ébauche de spire, en *S* italique, ou absolument comme de véritables spirochètes à 4, 5, 6, 8 tours de spire complète.

Les éléments les plus simples, en formes de vibrions, ressemblent à s'y méprendre au B. fusiforme de Vincent par ses extrémités nettement pointues et par ses dimensions longitudinales. D'ailleurs on a l'impression qu'il est un peu plus mince. Mais, à côté de ces éléments qui sont relativement rares dans les cultures du début, on voit les éléments longs qui ont l'aspect d'un véritable spirochète, à plusieurs tours de spire complète. Il est à remarquer cependant que les tours de spire sont différents de ceux que nous avons décrits pour *Spirochète* A, à cause de leur profondeur et de leur largeur, car, d'une façon générale, ils sont plus amples et moins profonds. Ajoutons qu'il s'agit d'une spirale complète, préformée, qui reste telle quelle quand le microbe est au repos.

La mobilité de ce microbe est extrêmement marquée. Ses mouvements sont ceux précédemment décrits pour *Spirochète* A (mouvements pendulaires, mouvements en avant et en arrière, mouvements de vrille, etc.).

Ce microorganisme, habitué de plus en plus au milieu artificiel, montre une tendance manifeste à devenir toujours plus court.

Après une dizaine de repiquages, les éléments sont presque tous en *S* italique ou possèdent deux ou trois tours de spire au maximum, tandis que les formes longues deviennent de plus en plus rares. Quelle est la raison de ce phénomène?

Tunnicliff (1), étudiant le bacille fusiforme de Vincent, a soutenu que ce microbe se présente tantôt sous son aspect ordinaire, tantôt sous l'aspect de véritables spirochètes extrêmement semblables à ceux que l'on voit dans l'angine et dans la stomatite ulcéro-membraneuse.

(1) Tunnicliff, The identity of fusif. and spir. *Jour. of inf. Diseases*, 1906.

En s'appuyant sur les constatations faites sur des cultures pures, il se demande si la symbiose fuso-spirillaire n'est pas, en somme, le résultat de différents aspects d'un même microbe, le fusiforme.

Nous ne partageons pas cette façon de voir, et en voici les raisons : quand nous avons isolé notre microbe, il se montrait presque exclusivement sous l'aspect de spirochète à plusieurs tours de spires. C'est dans la suite seulement que les formes courtes ont apparu. Il est donc raisonnable d'admettre que cette modification a été causée par sa végétabilité plus intense, à la suite de son adaptation aux milieux artificiels.

D'autre part, s'il est vrai que le bacille fusiforme de Vincent peut se présenter incurvé, à la façon d'un vibrion, et affecter la forme d'un *S* italique quand deux éléments se trouvent bout à bout, il est vrai aussi qu'on ne peut pas dire qu'il possède une véritable spire. Les formes les plus courtes de notre microbe se présentent au contraire comme une spire, très visible au repos, car, dans ces conditions, on remarque bien facilement qu'il ne repose pas sur le même plan et qu'il est hélicoïdal, visible de même, avec une extrême évidence, quand il est en mouvement. Mais, il y a encore ceci : dans les frottis de l'angine et de la stomatite ulcéro-membraneuse, souvent, très souvent même, on peut mettre en évidence avec le fusiforme de Vincent, non pas un seul, mais plusieurs spirilles, par la taille, par la façon de se colorer, par les caractères et le nombre des spires, très différents l'un de l'autre. On parle toujours d'un spirille de Vincent, mais en réalité nous croyons qu'il en existe plusieurs.

Ce microbe ne se colore pas facilement par les colorants ordinaires. La fuchsine diluée ne le colore pas du tout : le violet de gentiane aniliné le colore très mal après un bain prolongé. Mais les préparations ne sont pas bonnes, la teinte est très pâle et à peine visible. On obtient un meilleur résultat par la fuchsine de Ziehl à chaud ; mais la coloration élective est le Giemsa, qui le colore en bleu un peu pâle quand on fait les préparations en suivant la méthode rapide, et en bleu plus foncé si on prolonge le bain une dizaine d'heures. Cependant, il ne se colore pas uniformément, malgré tous les soins qu'on y apporte. On obtient au contraire de belles préparations par la

méthode de Burri, qui est très recommandable pour l'étude de tous ces microbes.

Par la coloration de Loeffler, modifiée par Nicolle et Morax, nous avons mis en évidence, dans le microbe en question, la présence de deux cils qui s'implantent aux deux extrémités; ils sont très minces, très flexueux. Mais il faut remarquer ceci, c'est qu'il nous a été absolument impossible de mettre en évidence, dans les formes longues, la présence de cils : ils n'étaient évidents que dans les formes courtes. Pourquoi cette différence, nous ne saurions le dire.

Il est vrai aussi qu'il est extrêmement difficile d'obtenir de bonnes préparations. Les colonies de ce microbe ne se dissocient qu'avec peine, et malgré tous les soins et les lavages il reste toujours accolé à leurs corps un peu de la substance du milieu nutritif, ce qui gêne beaucoup pour la coloration et l'examen de détails si délicats. Il est donc nécessaire de faire des réserves sur la ciliation de ce microbe, qui est indéniable, il est vrai, mais impossible à déterminer d'une façon tout à fait sûre, à cause des difficultés énumérées.

Il se reproduit, comme le premier, par division transversale. Il ne produit pas de spores. Les cultures dégagent une odeur de putréfaction.

Ce microbe, inoculé au cobaye, produit une nécrose très superficielle de la peau, avec formation d'abcès, mais l'animal guérit après deux semaines. On obtient de même un petit abcès chez le lapin, qui guérit en peu de temps.

Spirochète C. — Les colonies de ce microbe, anaérobie strict aussi, apparaissent lors du premier ensemencement, au 5[e] jour environ. Elles sont discoïdes, à bords nets, de couleur jaune safran très nette, d'un diamètre de 1 millimètre environ. Dans les ensemencements ultérieurs, les colonies apparaissent vers le deuxième jour, mais elles sont petites, à peine visibles. Elles grossissent ensuite et peuvent atteindre, dans un milieu suffisamment fluide, des dimensions considérables. Dans ce cas, elles perdent l'aspect discoïde et prennent la forme de petites boules d'un bleu jaunâtre avec un centre plus fortement coloré, qui tranche nettement sur le reste de la colonie. Le diamètre des colonies, si elles sont espacées, peut atteindre jusqu'à 3 ou 4 millimètres. Ce microbe cultive indifféremment

dans la gélose sucrée ordinaire et dans la gélose sucrée-sérum de cheval. La température optima de développement est de 37 degrés; il ne pousse pas à la température ordinaire.

Son développement dans le bouillon sucré et dans le bouillon de pomme de terre est presque nul.

Il ne donne pas de gaz dans la gélose sucrée, mais les cultures dégagent une odeur légèrement fétide. La vitalité de ce microbe est de 5 à 6 jours. Il ne produit pas de spores.

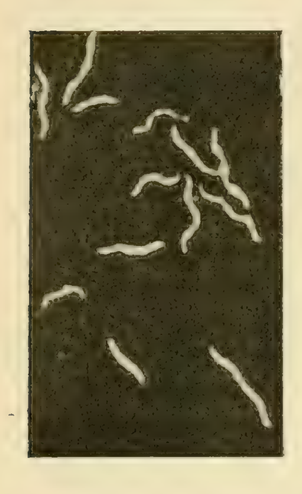


Fig. 7. — Spirochète C. Culture de 4 jours. — Prép. à l'encre de Burri. Gross., 1.800 D.

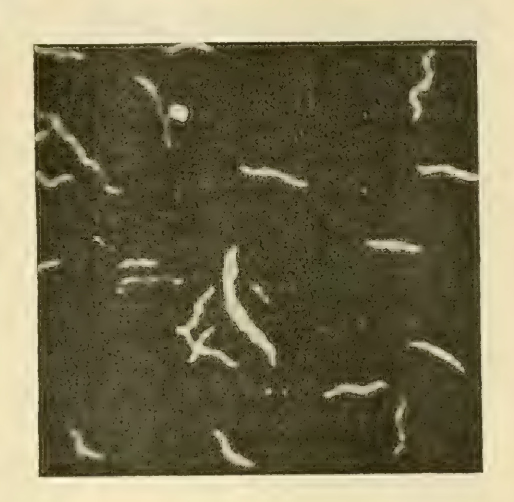


Fig. 8. — Spirochète C. On remarquera au milieu une forme qui peut faire penser à une division longitudinale. — Prép. à l'encre de Burri. Gross. 1.800 D.

L'étude en goutte pendante montre qu'il s'agit d'un spirochète pourvu de 2 à 4 tours de spires complètes, rarement plus long, extrêmement mobile. Ses mouvements ne diffèrent pas de ceux que nous avons décrits dans les autres espèces.

Un caractère particulier de ce microbe est le peu d'écart qu'il y a dans la longueur de ses éléments. Celle-ci est, en général, uniforme, d'une dizaine de μ environ. Les formes un peu plus courtes apparaissent dans les ensemencements ultérieurs, mais, en règle générale, le microbe possède une tendance assez nette à conserver toujours le même aspect. Son épaisseur est presque égale à celle de l'espèce A, mais les spires, tout en étant régulières et parallèles, sont nettement

différentes de celles que nous avons reconnues dans l'espèce A. Elles sont un peu moins serrées et moins profondes, car la profondeur de la spire, bien qu'évidente et nette, est à peine ébauchée. Les spires, comme dans les variétés précédentes, sont préformées et persistent aussi quand le microbe est à l'état de repos. Il se colore faiblement par les colorants ordinaires. Pour obtenir des images nettes, il faut faire agir un peu longuement le colorant. Il se décolore par la méthode de Gram.



Fig. 9. — Spirochète C. Cils péritriches. — Col. par la méthode Lœffler, Nicolle et Morax. Gross., 1.800 D.

Par la méthode de Burri, on obtient de très belles préparations. Par ce procédé, on met nettement en évidence les caractères des extrémités, qui sont nettement pointues.

Par la coloration de Lœffler, nous avons vu que ce spirochète est pourvu de très nombreux cils péritriches. Ils ressemblent aux cils que nous avons étudiés dans l'espèce A, mais ils sont plus rapprochés l'un de l'autre, de façon que l'élément microbien, tout en étant plus court que celui de l'espèce A, est pourvu d'un plus grand nombre de cils. Dans les formes courtes, les plus simples, on fait la même remarque. Ces éléments sont pourvus, en moyenne, de 5 à 6 cils, qui s'implantent, deux à chaque extrémité et deux autres au milieu du corps, de l'un ou de l'autre côté.

Pas plus que chez les précédents microbes, nous n'avons décelé aucune membrane ondulante. Ce spirochète se reproduit par division transversale. Nous n'avons jamais remarqué les formes longues, ni les autres formes que nous avons longuement étudiées sur l'espèce A.

Ce spirochète n'a aucun pouvoir pathogène pour les animaux de laboratoire.

Spirille D. — Ce microbe, anaérobie strict, pousse dans la

gélose sucrée au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, sous la forme de colonies rondes, irrégulières, moniformes, d'une couleur rougeâtre, de tailles différentes. Elles ont un diamètre de deux millimètres environ, mais dans les tubes où elles sont très espacées, elles peuvent atteindre des proportions énormes, de 5 millimètres de diamètre, et se présenter sous l'aspect d'une valve d'huître.

Cependant ce microbe, après quelques passages dans les milieux artificiels, a donné des colonies différant nettement par leur aspect de ce que nous venons de décrire. Il s'agissait de colonies punctiformes de coloration nettement saumonée, avec centre plus opaque, de même couleur, mais plus foncée, entourées d'un halo cotonneux, beaucoup plus pâle, d'où partaient de très fins prolongements donnant à la colonie l'aspect d'une châtaigne.

Croyant à une impureté (car ici on observait cet aspect différent des colonies dans le même tube et on ne pouvait, par conséquent, attribuer ce changement à une différence du milieu), nous avons procédé à de nouvelles séparations.

Or, nous avons, dans tous les passages ultérieurs, constaté que les colonies gardaient toujours leur aspect double comme nous venons de le décrire.

Cependant, il s'agissait d'un même et unique microbe, comme les recherches successives l'ont clairement démontré.

L'examen de ces colonies, en goutte pendante, nous a montré un microbe incurvé, extrêmement mobile, d'une épaisseur peu supérieure à 1 μ, à extrémités arrondies et très souvent pointues.

La longueur des différents éléments est variable. Certains ont la taille du fusiforme, mais, en général, ils sont plus longs, de 10 à 15 μ environ.

A l'état de repos, ils se présentent ou incurvés comme des vibrions, ou sous l'aspect d'un *S* italique de grande dimension. Mais quand ils se déplacent, les corps microbiens forment des spires régulières, parallèles l'une à l'autre, très nombreuses. Les mouvements de translation s'opèrent par rotation autour de l'axe longitudinal et ils sont parfaitement superposables, à notre avis, à ceux que nous avons remarqués dans les espèces précédentes.

Ce microbe offre aussi le type de mouvements pendulaires, extrêmement rapides, qui se font sur place et qui ont été décrits précédemment.

Dans les jeunes cultures, nous avons remarqué des formes étranges, qui nous semblent bien difficiles à interpréter : il s'agit de courts éléments présentant en leur milieu un renflement considérable leur donnant l'aspect d'un fuseau ventru.

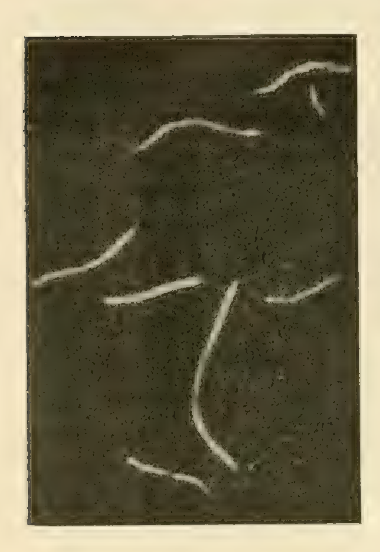


Fig. 10. — Spirille D. — Prép. à l'encre de Burri. Gross., 1.800 D.

Ce microbe est très difficile à colorer par les méthodes ordinaires. On obtient de bonnes colorations par le Ziehl à chaud. Il ne prend pas le Gram. Par la méthode lente de Giemsa, il se colore faiblement, d'une manière uniforme, mais il présente au milieu du corps un point ovoïde qui se colore intensément en bleu foncé. Ce point est central, même quand le microbe est en voie de division. Dans ce cas, le point chromophile se partage également dans les deux éléments fils et reste à leurs extrémités. Par la méthode de Burri, ce microbe se présente sous l'aspect déjà décrit, mais les spires s'effacent complètement. Par la méthode de Lœffler, nous n'avons découvert aucun cil, ce qui nous semble bien surprenant.

La vitalité de ce microbe est très courte, de quatre jours environ à l'étuve. Il pousse faiblement dans le bouillon sucré. Le milieu ne se trouble pas et, après quelques jours, on voit au fond du tube quelques maigres flocons agglutinés.

Les cultures dégagent une faible odeur de putréfaction. Dans les milieux solides, il n'y a pas production de gaz. Ce microbe ne donne pas de spores.

Inoculé au cobaye, il produit une petite eschare noirâtre, qui recouvre un abcès rempli d'un pus dense, crémeux. Mais l'animal guérit au bout d'une dizaine de jours.

L'inoculation au lapin produit, au lieu injecté, une légère infiltration qui dure quelques jours, puis disparaît sans même former d'abcès.

Pouvons-nous identifier les microbes ci-dessus étudiés avec les espèces déjà connues de microbes spiralés de la bouche?

On sait, en effet, depuis fort longtemps, qu'il existe des spirilles dans le tartre dentaire de la bouche de l'homme. Le premier observateur, dont le nom mérite d'être cité, c'est Leuwenhoeck, qui remarqua, parmi les innombrables bactéries de la bouche « semper magna cum admiratione dictae illi materiæ (tartre dentaire) multa exigua admodum animalcula jucundissimo modo se moventia ». Bühlmann (1) dans la suite les observa aussi, mais il ne se prononça pas sur leur nature animale ou végétale. Jicinus (2), au contraire, en fit des rapports très détaillés et les appela *denticola*, en les classant parmi les infusoires. Nous citerons encore Robin (3), qui les compta parmi les algues, pour venir à Miller (4), qui, en 1892, publia un fort intéressant livre d'ensemble sur les bactéries de la bouche.

Cet auteur donna la description exacte d'un microorganisme à forme vibrionienne, qu'il réussit à cultiver sur du sérum coagulé, et qui fut connu après lui, sous le nom de *Spirillum Sputigenum* de Miller.

Il décrivit aussi *Spirillum Dentium*, mais ne put le cultiver, n'ayant pas à sa disposition les méthodes modernes de cultures des anaérobies que nous possédons aujourd'hui.

Quand Schaudinn et Hoffmann découvrirent *Spirochæte pallida*, l'étude des microorganismes spiralés de la bouche prit un nouvel essort. C'est tout d'abord Schaudinn qui s'en occupe et étudie *Spirillum Buccalis* en partant du tartre dentaire et lui découvre une membrane ondulante. Lœwenthal (5) Hoffmann et Prowazek (6) ont publié ensuite des travaux fort remarquables sur les spirochètes de la bouche.

(1) Bühlmann, *Muller's Archiv für Anatomie*, 1840.
(2) Jicinus, *Walter's Ammon's Journ. für Chir.*, 1847.
(3) Robin, Des végétaux qui croissent sur les animaux vivants, 1847. *Histoire natur. des végét. parasites*, 1853.
(4) Miller, *Die Mikroorg. der Mundhöhle*. Leipzig, 1892.
(5) Lœwenthal, *Berl. klin. Woch.*, 1906, n° 10; *Mediz. Klinik*, 1906.
(6) Hoffmann et S. V. Prowazek, *Centr. für Bakt.*, Orig., t. XLI.

Hoffmann et Prowazeck ont étudié ces microorganismes à l'état frais et sur des préparations colorées au Giemsa ou par la méthode de Lœffler, après fixation par les vapeurs osmiques. Ils en distinguent trois variétés : une très petite, très mince, avec des ondulations nombreuses et très serrées, qui se voit seulement dans les colorations par la méthode de Lœffler, et ils la désignent sous le nom de *Spirillum Dentium* : une forme plus épaisse, plus grosse, avec des ondulations plus lâches et plus rares, qu'ils appellent *Spirillum Buccalis*, et une troisième, intermédiaire.

Dans les trois variétés, ils ont mis en évidence une sorte de cil et un prolongement du périplaste qui peut, chez Spirillum Buccalis, se gonfler et se détacher sous l'action de l'eau distillée. Ils ont confirmé ainsi les recherches de Lowenthal, au point de vue de la présence d'un cil inséré au milieu du corps de *Spirillum Sputigenum*, duquel ils donnent deux photographies. Cette ciliation particulière a été démontrée par Lowenthal et Zettnow (1).

Mais certainement, le travail le plus considérable sur ce sujet est celui de Mühlens et Hartmann (2). Ces deux auteurs ont réussi, nous l'avons déjà dit, à cultiver *Spirillum Dentium* et ils en ont fait une étude très minutieuse et très complète.

Les caractères culturaux et morphologiques de ce spirochète sont tout à fait différents de ceux que nous venons de décrire à propos des microbes cultivés par nous. La forme des colonies de *Spirillum Dentium*, l'impossibilité de le cultiver dans les milieux sans sérum, ses dimensions plus petites, suffisent à le distinguer complètement des microorganismes isolés par nous.

En outre, ils n'ont pas constaté de cils latéraux, mais ils ont mis en évidence, seulement sur certains éléments, un cil long et fin qu'ils ne considèrent pas comme un véritable cil, mais comme un prolongement du périplaste. Ces mêmes auteurs, qui soutiennent d'ailleurs comme Hartmann et Prowazek la nature protozoaire de ces microorganismes, ont étudié avec la technique de ces derniers le tartre dentaire, et ils ont constaté, chez *Spirillum Buccalis* à l'état frais, des

(1) Zettnow, *loco citato*.
(2) Muhlens et Hartmann, *loco citato*.

figures en Y, qu'ils considèrent comme une division longitudinale et, sur lame colorée, des cils terminaux et l'existence d'une membrane ondulante.

De tout ce que nous venons de passer en revue, très rapidement, il semblerait évident que les espèces décrites par nous mériteraient d'être séparées de tous les spirochètes actuellement connus de la bouche.

Il est très probable que les espèces A et C peuvent être rangées parmi les spirochètes de la bouche, intermédiaires à *Spirillum Buccalis* et à *Spirillum Dentium*. Leur ciliation particulière, leurs dimensions, l'aspect de leurs spires permettent ce classement provisoire entre le plus gros et le plus petit spirochète. L'espèce B, décrite par nous, ressemble par bien des caractères à *Spirillum Buccalis*, mais en réalité, nous ne pouvons pas l'affirmer. De nouvelles recherches trancheront la question qui mérite, à l'heure actuelle, d'être laissée en suspens.

Le microbe D doit être rangé à part, à cause de ce caractère essentiel qu'il n'est pas pourvu de spires comparables à celles que nous avons reconnues aux espèces précédentes. Il se rapproche, par bien des caractères, de *Spirillum Crassum* que Veillon et moi-même venons de décrire, mais il s'en différencie nettement par sa longueur et par le fait surtout qu'il s'est montré complètement dépourvu de cils (tout au moins de cils colorables par les méthodes ordinaires), tandis que *Spirillum Crassum* possède de très nombreux cils péritriches.

En terminant, nous tenons à remercier M. le Dr Roux, directeur de l'Institut Pasteur, qui a bien voulu nous accueillir et nous permettre ainsi de profiter de la merveilleuse installation de l'Institut Pasteur de Paris et de l'excellent enseignement qu'on y reçoit. Il nous est particulièrement agréable d'exprimer ici la reconnaissance la plus chaleureuse à notre cher maître et ami M. le Dr Veillon, qui a bien voulu nous donner une place dans son laboratoire et nous aider, à tous les instants, de son expérience et de ses conseils toujours bienveillants.

Nous devons les excellentes photographies que nous donnons au cours de ce travail, au talent de M. Jeantet, que nous sommes heureux de remercier ici.

RECHERCHES SUR LA SUCRASE
DE L'ASPERGILLUS NIGER

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'ALIMENT CARBONÉ SUR LA SÉCRÉTION DES DIASTASES

par G. GREZES.

Duclaux (1) pose de la manière suivante le problème qui nous occupe : « Soit une cellule pouvant vivre aux dépens de diverses substances qui, comme le sucre candi, l'amidon, la caséine, ont besoin, avant de devenir assimilables, alimentaires, de subir l'action d'une diastase spéciale à chacune d'elles. Cette cellule sécrète-t-elle d'une façon constante, et en quelque sorte nécessaire, toutes les diastases qu'elle a le pouvoir ou l'occasion d'utiliser; ou bien la production de ces diastases est-elle intermittente, subordonnée aux conditions d'alimentation et liée à la présence de l'aliment qu'il s'agit de digérer? En d'autres termes, cette cellule sécrète-t-elle à la fois toutes ces diastases ou seulement chacune d'elles au fur et à mesure de ses besoins? »

Il cite l'exemple de l'*Aspergillus glaucus* qu'il a étudié lui-même. Cette moisissure, cultivée sur du lactate de chaux, ne sécrète ni présure, ni caséase, ni sucrase, mais elle sécrète de l'amylase; cultivée sur saccharose, elle sécrète de la sucrase, mais pas d'amylase, ni de caséase, ni de présure. Sur lait, elle donne, au contraire, de la présure et de la caséase.

Remarquons que, pour Duclaux, l'expression « absence de diastase » n'a rien d'absolu, car il n'envisage dans ses expériences que les diastases qui diffusent dans le liquide alimentaire. Mais nous avons des exemples d'expériences où l'on a observé la disparition d'une diastase à l'intérieur de la cellule.

(1) Duclaux, *Microbiologie*, t. II, p. 83, 1899.

Katz (1) montre que le *Penicillium glaucum* cultivé sur l'amidon produit de l'amylase, et que, si l'on ajoute à l'amidon 5 p. 100 de saccharose ou 2 p. 100 de glucose dans le milieu de culture, la production de diastase est complètement supprimée : un extrait du mycélium broyé n'a aucune action sur l'amidon.

Dans une étude très étendue sur les diastases du *Monilia sitophila*, Went (2) cite un grand nombre de faits analogues. Il a cultivé cette moisissure sur des aliments carbonés très divers, choisis parmi les acides gras, les hydrates de carbone et les matières protéiques, et, d'après l'ensemble de ses résultats, il divise les diastases du *Monilia sitophila* en trois classes.

Certaines, la sucrase par exemple, sont sécrétées en présence de tous les aliments carbonés qui permettent au végétal de se développer.

D'autres, telles que la maltase, ne sont sécrétées qu'avec un certain nombre de ces aliments.

D'autres enfin, comme la présure, n'apparaissent qu'en présence de l'aliment qui nécessite leur intervention.

Il ne serait même pas nécessaire de prendre des aliments de nature différente pour observer l'apparition de nouvelles diastases. Deux corps stéréo-isomères pourraient donner lieu à des sécrétions différentes.

Pottevin (3) obtient, à partir du mycélium de l'*Aspergillus niger*, cultivé sur une solution de méthyl-d-galactoside β, un macéré inactif sur le méthyl-d-galactoside α. Mais vient-on à introduire sous la plante le mélange des deux galactosides, le macéré est actif à la fois sur le galactoside α et sur le galactoside β.

Longtemps avant, on avait observé des faits analogues chez les levures et les bactéries.

Bourquelot (4) avait établi que la levure de bière en activité,

(1) Katz, *Jahrb. Wiss. Bot.*, 1898, t. XXXI, p. 533.
(2) Went, *Jahrb. Wiss. Bot.*, 1901, t. XXXVI, p. 611.
(3) Pottevin, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XVII, p. 49, 1903.
(4) Bourquelot, *Journal de l'Anat. et de la Physiol.*, p. 209, 1886.

dans une solution de glucose ou de sucre de canne, ne produit pas de ferment capable de dédoubler le maltose, mais que, placée en présence de ce sucre, elle donne un ferment qui le dédouble.

Wortmann (1), en étudiant l'utilisation de l'amidon par les bactéries, avait constaté que toute sécrétion d'amylomaltase cesse lorsque, avec l'amidon, on introduit dans le milieu de culture un autre élément carboné plus facilement assimilable, comme le glucose. Ces résultats tendent à montrer qu'étant donné une plante qui ne sécrète pas normalement une diastase, il est possible qu'elle la sécrète en présence d'un aliment convenable.

Ce fait important a été récemment mis en doute.

Dans une étude sur les diastases du *Penicillium Camemberti*, Wayland Dox (2), n'ayant jamais observé la disparition d'une diastase sous l'influence de l'aliment carboné, conclut en disant : « Il n'est pas prouvé que des diastases qui ne sont pas formées normalement par l'organisme en quantités appréciables, peuvent être développées par un mode de nutrition spécial. L'influence de l'addition d'une substance particulière au milieu de culture ne consiste donc pas à développer une diastase entièrement nouvelle, mais à stimuler la production de la diastase correspondante qui est normalement formée dans toutes les conditions. »

Cet auteur n'ayant employé dans toutes ses expériences que des hydrates de carbone comme aliment carboné, il y avait lieu de se demander si ses conclusions ne seraient pas en défaut lorsqu'on prendrait un aliment étranger à ce groupe.

C'est ce doute qui a inspiré notre travail.

Nous avons étudié les diastases sécrétées par l'*Aspergillus niger* en offrant à cette moisissure de l'acide succinique pour tout aliment carboné, et nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux d'une culture sur sucre.

(1) Wortmann, *Zeitschr. für physiol. Chemie*, t. VI, p. 287, 1882.
(2) Arthur Wayland Dox, The intracellular enzyms of *Penicillium* and *Aspergillus*. *U. S. Department of Agriculture*, 1910.

*
* *

Méthode de culture. Choix de l'aliment carboné. — Nos expériences ont été faites sur des cultures pures d'*Aspergillus niger*.

Le liquide était introduit dans des fioles d'Erlenmeyer et stérilisé à l'autoclave à 115 degrés pendant vingt minutes; ensemencé ensuite à partir d'une culture pure avec un fil de platine et placé dans une chambre thermostat à la température de 37 degrés. Nous avons adopté comme milieu de culture le milieu Raulin, dont nous avons éliminé le sucre et l'acide tartrique, suivant notre idée de prendre un aliment carboné étranger au groupe des sucres et aussi éloigné que possible de ce groupe; ne renfermant pas, par exemple, de fonction alcool dans sa molécule. Nous avons tenté des cultures sur quelques acides organiques; avec les acides gras en particulier, nous n'avons pas obtenu de bonne récolte, mais avec l'acide succinique, dont la molécule est énergétique, nous avons eu des résultats très satisfaisants.

L'*Aspergillus niger* s'accommode fort bien de cet aliment pendant un grand nombre de générations; nous avons pu remarquer qu'au bout de la soixantième il était encore très vivace.

Pour déterminer la dose d'acide qui convient le mieux à ce végétal, nous avons fait l'expérience suivante : nous avons ensemencé cinq séries de trois fioles d'Erlenmeyer de 100 cent. cubes, contenant chacune 25 cent. cubes de liquide de culture avec des spores de la 20[e] génération, en ayant soin d'avoir la même concentration en acide succinique dans chaque fiole d'une même série. Les myséliums récoltés au bout de quatre jours ont été séchés dans la chambre thermostat à 37 degrés jusqu'à poids constant.

Ces nombres ne sont pas tout à fait comparables, car, à la même époque, toutes les récoltes n'étaient pas arrivées au même stade de leur développement; les trois dernières séries étaient en effet bien sporulées, alors que les récoltes de la première série ne présentaient encore aucune spore.

Voici les résultats résumés en tableau :

CONCENTRATION DU LIQUIDE DE CULTURE en acide succinique.	1re série. — 5 p. 100.	2e série. — 4 p. 100.	3e série. — 3 p. 100.	4e série. — 2 p. 100.	5e série. — 1 p. 100
Poids des récoltes.	$0^{g}395$ 0,355 0,365	$0^{g}282$ 0,325 0,297	$0^{g}218$ 0,228 0,190	$0^{g}132$ 0,145 0.137	$0^{g}37$ 0.48 0.53
»	1,115	0,907	0,636	0.414	0,138
Rapport du poids de récolte au poids d'acide.	0,299	0,302	0.282	0.276	0.183

Néanmoins nous voyons que, jusqu'à la quatrième série, les rendements relatifs à l'acide succinique ne varient pas beaucoup, et comme c'est avec les concentrations de 3 ou 4 p. 100 que l'aspect des cultures nous a paru se rapprocher le plus de celui qu'elles affectent sur le sucre, nous avons adopté l'une ou l'autre de ces concentrations.

* * *

Étant en possession d'un milieu de culture dans lequel le sucre a été remplacé par l'acide succinique, milieu qui convient au développement de l'*Aspergillus niger*, nous nous sommes proposé de vérifier si les diastases, dont on a démontré l'existence lorsque la moisissure pousse sur le saccharose, sont encore élaborées en présence de ce nouvel aliment. Ne pouvant faire ce travail pour toutes les diastases qui ont été signalées, nous avons pensé que nous devions d'abord étudier les diastases qui exercent leur action sur les sucres, puisque à un aliment appartenant à ce groupe nous avons substitué un aliment qui lui est étranger.

En réalité, nous avons recherché : la sucrase, l'amylase, la maltase, l'inulase et l'émulsine, dans le mycélium récolté sur l'acide succinique.

Mode d'extraction des diastases. — Pour obtenir ces diastases, nous avons opéré de la façon suivante : les mycéliums extraits du vase de culture étaient dépliés et lavés rapidement sous un jet d'eau distillée. Ils étaient essorés ensuite entre deux feuilles de papier filtre, portés dans une chambre thermostat à 36 degrés et, après dessiccation complète, réduits en poudre à l'aide d'un moulin à café turc. Nous faisions macérer cette poudre dans de l'eau distillée pendant quelques heures, et, au bout de ce temps, nous filtrions sur un filtre de papier pour avoir une solution limpide.

Etude de la solution diastasique. — C'est dans cette solution que nous avons recherché les diastases indiquées précédemment en faisant l'expérience suivante : nous préparions deux tubes à essai contenant le même volume d'une solution de la substance à hydrolyser; dans le premier, nous introduisions un volume déterminé de la solution diastasique, et dans le second, nous introduisions le même volume de la solution diastasique, mais après l'avoir préalablement maintenu pendant cinq minutes dans l'eau bouillante. Nous placions les deux tubes dans une étuve à 35 degrés, et, au bout d'un temps convenable, nous dosions le pouvoir réducteur dans les deux tubes par la méthode de M. G. Bertrand (1). Dans toutes les expériences, durant plus de deux heures, nous avons ajouté du toluène comme antiseptique.

Résultats expérimentaux. — Dans une de nos expériences, 2 grammes de mycélium récolté sur une solution d'acide succinique à 2,5 p. 100 au bout de cinq jours, ont été traités par 20 cent. cubes d'eau pendant quatre heures. Pour chaque diastase, nous avons pris 2 c.c. 5 de la solution d'épreuve, 1 cent. cube de la solution diastasique, et nous avons dosé le pouvoir réducteur après quarante-huit heures sur le contenu total des tubes suivant le tableau ci-après :

(1) G. Bertrand, *Bull. Soc. chimique*, t. XXXV, p. 1285, 1906.

	SUCRASE	AMYLASE	MALTOSE	INULASE	ÉMULSINE
Composition de la solution d'épreuve.	1 gr. sucre. + 20 c. c. eau.	1 gr. fécule dans 100 c.c. d'eau portée à l'ébullition pendant 2 minutes.	0 gr. 90 maltose + 20 c. c. eau.	0 gr. 375 inuline + 20 c. c. eau.	0 gr. 350 amygdaline + 10 c. c. eau.
Cuivre réduit dans le 1er tube.	99,5	59.7	159	26.8	132 »
Cuivre réduit dans le tube témoin.	9,9	4.9	124	5.9	9,9

Nous voyons que l'*Aspergillus niger*, cultivé sur l'acide succinique, élabore encore les cinq diastases étudiées.

Remarque. — Le résultat qui concerne la maltase est à rapprocher de celui qu'a obtenu Went avec le *Monilia sitophila*.

Cet auteur a observé la disparition de cette diastase en prenant le succinate de soude comme aliment carboné ; mais il faut remarquer qu'il opérait sur 1 milligramme de récolte, et cette quantité nous paraît trop faible pour permettre d'affirmer un résultat négatif.

On peut penser, en effet, que si on avait eu plusieurs grammes de récolte, comme dans nos expériences, le résultat aurait été changé.

ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA SÉCRÉTION DE SUCRASE

Dans les expériences qui précèdent, nous avons constaté qu'aucune des diastases recherchées ne disparaissait du mycélium de l'*Aspergillus niger* lorsque, dans le milieu de culture, on substituait au saccharose un corps très différent au point de vue chimique, comme l'acide succinique. Cela ne veut pas dire que l'aliment carboné n'a aucune influence sur les sécrétions diastasiques : de nombreux auteurs (1) ont reconnu que

(1) Colin, *Thèse de doctorat*. Paris, 1911. — Wayland Dax, *loc. cit.*

cette influence se faisait sentir sur la quantité de diastase élaborée et nous nous sommes proposé d'étudier quantitativement comment elle se manifeste dans le cas de la sucrase.

Pour réaliser cette étude, il faut mesurer la quantité de diastase présente dans un poids donné de mycélium, ce que l'on fait généralement à l'aide de deux séries d'opérations. Dans la première série, on extrait la diastase des cellules en la faisant passer dans une solution, et dans la seconde on mesure l'activité de cette solution. La sucrase est, parmi les diastases connues, celle qui se prête le mieux à cette mesure : elle diffuse facilement à l'extérieur des cellules et nous savons, en outre, mesurer l'activité de ses solutions depuis les travaux de M. Fernbach (1).

Quant à la méthode que nous avons employée, elle ne diffère de celle de M. Fernbach que dans le mode d'extraction de la diastase. Cet auteur broie le mycélium immédiatement après la récolte et le fait macérer avec de l'eau pour obtenir la solution diastasique ; en même temps, il récolte une seconde culture, venue dans les mêmes conditions que la première, il la fait sécher, la pèse et admet que le poids obtenu est aussi celui de la première culture. Nous n'avons pas pu le suivre dans cette série d'opérations, car cette hypothèse, qui peut être légitime lorsqu'on a affaire à des cultures sur saccharose qui couvrent rapidement toute la surface du liquide, devient d'une application presque impossible lorsqu'on a affaire à des cultures qui ne couvrent pas bien, comme celles que nous avons obtenues avec l'acide succinique. Pour parer à cet inconvénient, nous avons cru devoir adopter une méthode suggérée par le mode d'extraction des diastases, que nous avions employé dans l'étude qualitative.

Principe de la méthode. — Pour comparer l'activité de deux mycéliums, nous les faisons sécher, dans les mêmes conditions, jusqu'à poids constant ; nous les réduisons en une poudre homogène et nous faisons macérer des poids égaux des deux poudres dans un même volume d'eau. Nous déterminons ensuite l'activité de la solution obtenue de la façon suivante :

Pendant deux heures, à 36 degrés, nous avons fait agir, sur

(1) Fernbach, *Thèse de doctorat*. Paris, 1890.

1 gramme de sucre, un volume de solution diastasique tel qu'il n'y ait pas plus de 100 milligrammes de sucre hydrolysé: nous n'avons jamais eu ainsi plus de 20 p. 100 de sucre hydrolysé et nous pouvons admettre que le pouvoir réducteur, déterminé par la méthode de M. G. Bertrand, est proportionnel à la quantité de sucrase.

Le volume total est toujours ramené à 10 cent. cubes, et nous opérons en présence de $\frac{1}{1000}$ d'acide acétique au lieu de $\frac{1}{100}$, comme l'indique M. Fernbach (1), parce que des expériences poursuivies au laboratoire de M. G. Bertrand (expériences que nous avons répétées) ont montré que c'est avec la dose de $\frac{1}{1000}$ qu'on obtient l'effet maximum.

Dans chaque cas une expérience témoin, faite avec le même volume de solution diastasique bouillie, nous indique quelle est la part de l'acide dans l'hydrolyse ; de sorte que les nombres donnés se rapportent uniquement à l'action de la sucrase elle-même.

Étude expérimentale de la méthode. — Nous avons recherché quelles sont les meilleures conditions expérimentales pour l'application de cette méthode. Nous faisons macérer les petites quantités de poudre sur lesquelles nous opérons dans de petits flacons de 50 cent. cubes; nous avons soin de mouiller la poudre en la malaxant avec une petite fraction de l'eau que nous voulons employer et nous bouchons le flacon.

Ces précautions étant prises, nous avons fait varier les principaux facteurs sur lesquels nous pouvions agir.

Influence de la durée de la macération. — Nous avons préparé six flacons avec 0 gr. 5 de poudre et 25 cent. cubes d'eau distillée. Nous les avons laissés à 36 degrés, sans les agiter, pendant des temps différents.

L'activité de chaque solution diastasique a été déterminée aussitôt après qu'elle a été obtenue.

Durée de la macération.	1 heure.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h. 1/2
	—	—	—	—	—	—
Cuivre réduit	95 milligr.	120	130	120	119	121

Nous avons répété cette expérience aux environs de 0 degré;

(1) Fernbach, *loc. cit.*, p. 37.

nos flacons étaient placés dans de la glace pilée, mais en agitant fréquemment.

Durée de la macération.	1 heure.	2 h.	3 h.	4 h.
	—	—	—	—
Cuivre réduit	112 milligr.	125	115	115

Ces résultats montrent que l'activité obtenue croît d'abord avec la durée de la macération, arrive à sa valeur maximum et retombe à une valeur légèrement inférieure qui demeure constante.

Si, pendant la macération, il y avait simplement dissolution et diffusion de la sucrase, l'activité maxima devrait se maintenir. Puisqu'il n'en est pas ainsi, nous devrions, pour faire des mesures correctes, répéter pour chaque mycélium l'expérience que nous venons de décrire et convenir de comparer entre elles les valeurs maximum de l'activité.

En réalité, nous nous sommes borné à une seule macération de durée toujours égale à deux heures.

Influence de la température. — Dans l'expérience faite à 0 degré, nous avons atteint plus rapidement la valeur maximum de l'activité, parce que nous agitions fréquemment, mais cette valeur est restée inférieure à celle qu'avait donnée l'expérience faite à 36 degrés. Il en est de même de la valeur constante finale, et ce fait est dû à la différence de température.

L'expérience suivante, faite sur une autre poudre en donnant à toutes les macérations une durée de deux heures, montre que, pour une durée de macération constante, l'activité obtenue varie avec la température.

Température. . . .	18°	28°	34°	36°	37°
	—	—	—	—	—
Sucre interverti . .	102 milligr.	108	114	114	115

Au point de vue expérimental, nous voyons que la température peut varier de 2 ou 3 degrés sans que l'on observe une différence d'activité sensible. Dans tout ce qui suit, les macérations ont été faites aux environs de 36 degrés.

Influence de la concentration. — Nous avons fait macérer des poids de poudre variables avec le même volume d'eau, 10 cent. cubes; l'activité a été déterminée en faisant agir sur

le même poids de sucre des volumes de solution indiqués dans le tableau.

Nous donnons, dans la dernière colonne, le poids de sucre interverti, calculé, à partir du résultat de la dernière expérience, en supposant que l'activité des solutions obtenues soit proportionnelle au poids de poudre employée.

POIDS DE POUDRE	VOLUME DE SOLUTION	SUCRE INTERVERTI	
		Trouvé.	Calculé.
—	—	—	—
1 gramme.	0 c. c. 5	244	270
0 gr. 5	1 c. c. »	262	270
0 gr. 2	1 c. c. 5	166	162
0 gr. 1	2 c. c. »	108	»

Nous voyons que l'hypothèse faite est pratiquement exacte pour les trois dernières expériences, c'est-à-dire lorsqu'on traite la poudre par des quantités d'eau variant entre 20 et 100 fois son propre poids.

Influence de la réaction du milieu. — Les liquides de macération se sont montrés constamment acides à la phtaléine et alcalins à l'hélianthine, et nous avons constaté, dans une expérience préliminaire, qu'en prenant 0 gr. 1 de la poudre employée pour 10 cent. cubes d'eau, 5 cent. cubes du liquide de macération nécessitaient 0 c. c. 75 d'une solution de soude $\frac{N}{100}$ pour virer à la phtaléine.

Nous avons alors préparé cinq macérations comme il suit :

Macération I 0 gr. 1 de poudre + 2 c.c. de NaOH $\frac{N}{100}$ + 8 c.c. d'eau (*)

Macération II 0 gr. 1 de poudre + 1 c.c. de NaOH $\frac{N}{100}$ + 9 c.c. d'eau.

Macération III 0 gr. 1 de poudre + 0 c.c. de NaOH $\frac{N}{100}$ + 10 c.c. d'eau (**)

Macération IV 0 gr. 1 de poudre + 1 c.c. de SO^4H^2 $\frac{N}{100}$ + 9 c.c. d'eau.

Macération V 0 gr. 1 de poudre + 2 c.c. de SO^4H^2 $\frac{N}{100}$ + 8 c.c. d'eau (***)

(*) Pour être alcalin à la phtaléine.
(**) Réaction naturelle.
(***) Pour être acide à l'hélianthine.

Nous espérions avoir atteint l'alcalinité à la phtaléine dans la macération I et l'acidité à l'hélianthine dans la macération V; en réalité, au bout de deux heures, tous les liquides de macération ont été encore acides à la phtaléine et alcalins à l'hélianthine. Avant de filtrer, nous avons ajouté de l'acide $\frac{N}{100}$, de la soude $\frac{N}{100}$ ou de l'eau, de façon à avoir 12 cent. cubes de liquide dans tous les cas et à revenir à la réaction naturelle, et nous avons attendu quelques instants.

En mesurant l'activité des solutions diastasiques, nous avons trouvé :

Numéro de la macération .	I	II	III	IV	V
	—	—	—	—	—
Sucre interverti	114	116	118	108	101

Il en résulte que la réaction la plus favorable à la préparation des solutions de sucrase, suivant le procédé employé, est la réaction du milieu naturel.

L'action défavorable des acides est très marquée; celle des bases est moins apparente.

Approximation des résultats. — En résumé, il résulte des expériences qui précèdent que la méthode est fidèle, qu'elle donne facilement le même résultat quand on opère avec la même poudre. Mais les activités des solutions obtenues en partant de deux mycéliums différents sont-elles dans le même rapport que les richesses en sucrase de ces derniers?

Il en serait ainsi si les poudres qui ont subi une première macération ne renfermaient pas de sucrase. Les expériences qui suivent vont nous montrer que cette condition n'est pas loin d'être réalisée.

Nous avons fait subir une deuxième macération à la même poudre, après l'avoir filtrée sur un filtre taré à l'avance. Pour recueillir toute la poudre, nous lavions le flacon à plusieurs reprises avec la solution filtrée. Cette opération terminée, nous pesions le filtre avec la poudre humide. Leurs poids à l'état sec étant connus, nous obtenions ainsi le poids du liquide qui les imprégnait.

En admettant que la richesse de ce liquide en sucrase soit la même que celle de la première solution, on peut calculer quelle sera l'activité du nouveau liquide de macération si, dans la première opération, toute la diastase est entrée en solution.

En opérant une seconde macération de deux heures avec la poudre encore humide, nous n'avons eu aucun gain de sucrase. Mais en faisant sécher au préalable le filtre avec la poudre à 36 degrés, pendant vingt-quatre heures, nous avons eu une augmentation d'activité qui a été le $\frac{1}{20}$ de l'activité de la première macération pour un mycélium récolté sur du sucre et le $\frac{1}{8}$ pour un mycélium récolté sur de l'acide succinique.

Pour ce qui est de ces deux mycéliums, d'activité très différente, nous voyons qu'en prenant pour valeur du rapport de leur richesse en sucrase, la valeur de celui des activités des deux solutions diastasiques obtenues dans la première macération, nous aurions commis une erreur relative d'environ $\frac{1}{8} - \frac{1}{20} < \frac{1}{10}$.

L'approximation de ces mesures est suffisante pour nous permettre de suivre les variations de la sécrétion de sucrase par l'*Aspergillus niger*, quand on change le milieu de culture.

Nous allons voir, en effet, que l'ordre de grandeur de ces variations est bien supérieur à celui des erreurs que comporte la méthode.

*
* *

Dans toutes les expériences qui suivent, les poudres mycéliennes sont traitées par cent fois leur poids d'eau pendant deux heures à 36 degrés; nous filtrons et nous déterminons immédiatement l'activité du liquide de macération par la méthode indiquée. Nous ramenons la quantité de sucre interverti trouvée à ce qu'elle aurait été si on avait pris 4 cent. cubes de ce liquide, et, par convention, nous appelons activité du mycélium la quantité de sucre interverti ainsi obtenue. Cette activité se rapporte à 40 milligrammes de poudre.

I. *Application à l'étude de l'influence de l'aliment.* — Afin de mettre en lumière l'influence de l'aliment carboné sur la sécrétion de sucrase par l'*Aspergillus niger*, nous avons étudié les cultures suivantes au point de vue de leur activité :

1° Une culture venue sur saccharose non interverti ;
2° Une culture venue sur saccharose interverti ;
3° Une culture venue sur acide succinique à 3 p. 100.

Dans ces trois cas, les spores ensemencées provenaient d'une culture sur saccharose.

Il est difficile de savoir à quelle époque on doit récolter les myceliums des différentes cultures pour avoir des résultats comparables, et, pour éviter cette incertitude, nous avons étudié dans chaque cas les variations d'activité avec l'âge de la culture. Le tableau suivant résume les résultats que nous avons obtenus :

	ALIMENT		
	SACCHAROSE non interverti.	SACCHAROSE interverti.	ACIDE SUCCINIQUE à 3 p. 100.
	—	—	—
	Activité.	Activité.	Activité.
Age de la culture :			
16 heures	140	0	»
16 heures + 1 jour . .	392	285	0
16 heures + 2 jours. .	172	216	9
16 heures + 3 jours. .	120	61	6
16 heures + 4 jours. .	72	54	2
16 heures + 5 jours. .	24	»	»

Ces résultats sont d'ailleurs représentés par des courbes jointes au texte ; ce sont les courbes I, II et III qui leur correspondent.

Avant de les interpréter, il est intéressant de les comparer à ceux qu'a obtenus M. Fernbach (1), en mesurant la quantité de sucrase que renferme, à différents âges, une culture d'*Aspergillus* sur saccharose. Les nombres qu'il donne expriment la quantité totale de diastase présente dans le mycélium ; si on les divise par les poids des récoltes qu'il indique à côté, on les rapporte à l'unité de poids. D'autre part, comme nous avons

(1) Fernbach, *loc. cit.*

effectué les récoltes aux époques choisies par M. Fernbach, les résultats de nos expériences se rapportant toujours à un même poids de mycélium, ils doivent varier suivant la même loi que les nombres calculés comme il vient d'être dit, c'est-à-dire qu'ils doivent être entre eux dans un rapport constant.

D'après cela, voici le tableau comparatif que nous avons établi :

AGE de la culture.	ACTIVITÉ d'après M. Fernbach.	ACTIVITÉ d'après nos expériences.	RAPPORT
10 heures	89	392	$\frac{392}{89} = 4,4$
40 heures + 1 jour .	37	172	$\frac{172}{37} = 4,6$
10 heures + 2 jours.	25	120	$\frac{120}{25} = 4,8$
40 heures + 3 jours.	25	72	$\frac{72}{25} = 2,9$
10 heures + 4 jours.	21	24	$\frac{24}{21} = 1,1$

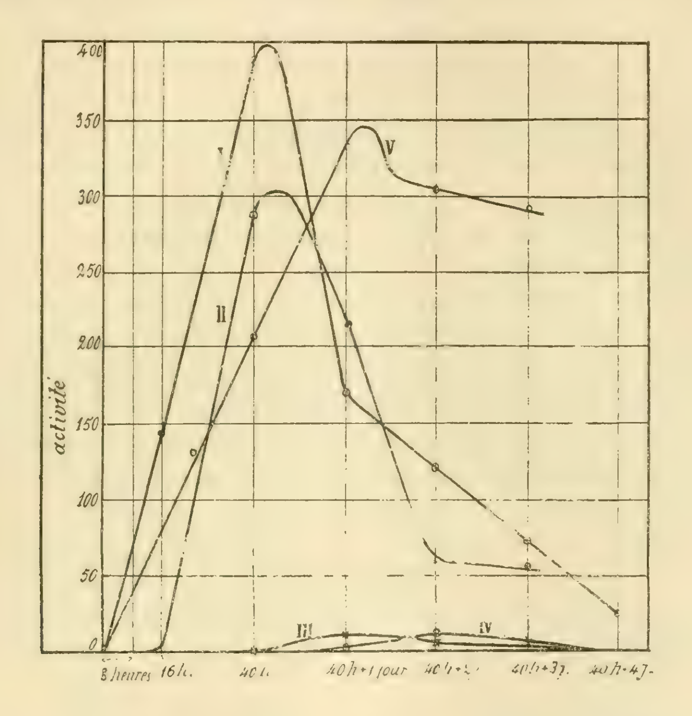
Pour les trois premières déterminations, malgré la différence du mode expérimental, les rapports concordent à 1 p. 10 de leur valeur, mais pour les deux dernières ils ne concordent pas du tout et, à partir de la troisième, ils décroissent même en progression arithmétique.

Le désaccord entre les résultats donnés par les deux méthodes pour les mycéliums âgés semble bien tenir à une cause régulière; il est remarquable qu'il se produit au moment où la richesse en sucrase du liquide de culture augmente brusquement, de 5 à 10 d'après M. Fernbach, mais de nouvelles expériences seraient nécessaires pour mettre cette cause entièrement en évidence.

Ceci posé, remarquons que les courbes obtenues sont très différentes, la nature de l'aliment carboné a donc une influence régulatrice considérable sur la sécrétion de sucrase par l'*Aspergillus niger*.

Prenons pour terme de comparaison la courbe I obtenue avec l'*Aspergillus* cultivé sur saccharose. La richesse du mycélium en diastase, nulle à l'origine, croît rapidement, passe par un maximum et décroît en deux temps, d'abord rapidement, puis plus lentement et proportionnellement au temps.

Lorsqu'on substitue un autre aliment au saccharose, on obtient les courbes II et III déplacées vers la droite et aplaties, la sécrétion de sucrase est retardée et le maximum d'activité du mycélium est diminué. Les deux caractères du phénomène sont de plus en plus accentués à mesure que la nature de l'aliment s'éloigne davantage de celle du saccharose.



On voit qu'en passant du saccharose à l'acide succinique le maximum d'activité décroît dans le rapport de 40 à 1 environ. Cette diminution est si grande qu'on peut se demander si, dans le dernier cas, la sécrétion de sucrase ne persiste pas grâce à un phénomène d'hérédité.

II. *Application à l'étude du rôle de l'hérédité.* — Pour vérifier cette hypothèse, nous avons fait successivement soixante cultures d'*Aspergillus* sur l'acide succinique et, avec les spores de la soixantième génération, nous avons mis en train deux séries de cultures, l'une sur acide succinique et l'autre sur saccharose non interverti.

En suivant leur développement, nous avons observé que leur aspect était bien différent de celui que présentent les cultures obtenues dans les mêmes conditions avec les spores d'un mycélium habitué au saccharose. Les spores provenant d'une culture sur saccharose, ensemencées sur acide succinique, nous donnaient un mycélium qui sporulait sensiblement, à mesure qu'il se formait, si bien que nous n'avons pu observer de mycélium sans spores. Les spores de la soixantième génération, au contraire, nous ont donné un mycélium d'abord blanc, anfractueux, qui a sporulé d'abord contre les parois du vase ; la sporulation s'est arrêtée ensuite et la surface du mycélium, au lieu de devenir franchement noire, est restée grise, tandis que la face inférieure et le liquide de culture prenaient une teinte vineuse, rouge violacé.

Nous avons pu constater que les mêmes spores ensemencées sur du saccharose nous donnaient une culture florissante, mais qui, par la suite, se comportait tout à fait comme la précédente. Ces constatations rendent d'autant plus frappants les résultats que nous avons obtenus en étudiant la sécrétion de sucrase dans les deux séries de culture dont nous nous occupons.

	ALIMENT	
	ACIDE SUCCINIQUE à 3 p. 100.	SACCHAROSE non interverti.
Age de la culture :	—	—
24 heures.	»	132
40 heures.	0 »	208
40 heures + 1 jour.	3 »	332
40 heures + 2 jours	9,5	304
40 heures + 3 jours	3 »	230

Ces résultats sont, en outre, représentés par les courbes IV et V.

La comparaison des courbes I et V, obtenues avec des cultures sur saccharose, nous montre qu'en prenant des spores d'un mycélium habitué à l'acide succinique au lieu de spores d'un mycélium habitué au saccharose, nous nous trouvons dans des conditions moins favorables à l'élaboration de la sucrase : la sécrétion de cette diastase est retardée et diminuée légèrement. Dans les cas des courbes III et IV, c'est-à-dire lorsqu'on prend l'acide succinique pour aliment, nous observons encore que la

sécrétion de sucrase est plus rapide avec les spores d'un mycélium habitué au saccharose et, si nous ne trouvons pas de différence appréciable pour les activités maxima, cela tient sans doute à ce que nous sommes en présence de quantités de sucrase trop faibles pour que notre méthode nous permette de la déceler.

Conclusion.

Les phénomènes dus à l'hérédité nous apparaissent comme capables d'accentuer l'influence de l'aliment carboné sur la sécrétion de sucrase ; c'est en présence de saccharose, et avec des spores d'un *Aspergillus* habitué à cet aliment, que la sécrétion de sucrase est la plus rapide et la plus abondante ; et c'est lorsqu'on ensemence des spores d'un *Aspergillus* habitué à l'acide succinique sur cet aliment qu'on se trouve dans les conditions les moins favorables à la sécrétion de sucrase.

Néanmoins, il ne semble pas que, grâce à ces phénomènes, on puisse observer la disparition complète de sucrase chez l'*Aspergillus*; le fait qu'au bout de soixante générations la sécrétion de sucrase n'a pas diminué, autant qu'on peut en juger par la méthode employée, tend à montrer que le pouvoir de produire cette diastase, étroitement lié à la cellule de l'*Aspergillus niger*, est inséparable de son développement.

Des expériences analogues poursuivies sur d'autres espèces seraient nécessaires pour généraliser cette conclusion.

Ce travail a été fait au Laboratoire de chimie biologique de la Faculté des sciences (Institut Pasteur) sous la bienveillante direction de M. G. Bertrand.

Nous le remercions sincèrement de ses conseils éclairés et de ses encouragements si précieux à un jeune expérimentateur.

STATISTIQUE DES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR DE SAMARA

POUR LES ANNÉES 1886-1910

par le Dr M. ACKER.

L'Institut Pasteur du Zemstwo de Samara a commencé à fonctionner le 2 juillet 1886.

Depuis cette époque jusqu'au 31 décembre 1910, c'est-à-dire pendant une période de vingt-quatre ans et six mois, 20.185 personnes ont subi le traitement anti-rabique à cet Institut.

Ces 20.185 traités comprennent 13.397 hommes (66,4 p. 100) et 6.788 femmes (33,6 p. 100). Dans ce nombre on y trouve 5.839 cas d'enfants au-dessous de dix ans, soit 28,9 p. 100).

Dans ces 20.185 personnes traitées sont comprises 1.909 personnes non mordues, mais ayant été en contact quelconque avec des animaux enragés, 93 personnes mordues par des animaux sains, comme cela a été reconnu plus tard, et 18.183 personnes mordues par des animaux enragés ou suspects de rage.

Sur ces 18.183 personnes mordues, 228 sont mortes de rage. La mortalité globale est donc de 1,25 p. 100. Chez 60 personnes la rage s'est déclarée pendant le traitement, 63 sont mortes dans les quinze jours qui ont suivi la fin du traitement et 105 plus de quinze jours après la dernière inoculation. La mortalité réduite est alors de 0,58 p. 100.

Le tableau suivant indique la répartition de ces 18.183, d'après le degré de certitude de la rage et aussi d'après l'espèce d'animaux mordeurs et la place des morsures, ainsi que la mortalité correspondant à chacun de ces groupes.

Comme on le voit d'après le tableau ci-dessous, pour 8.779 personnes la rage de l'animal mordeur n'a pu être constatée, ni expérimentalement, ni par examen vétérinaire. Mais si l'on se reporte aux renseignements fournis par les mordus et aux circonstances dans lesquelles s'est produite la morsure, il est

	NOMBRE de MORDUS	P. 100	MORTS DE RAGE			MORTALITÉ	
			AU COURS des inoculations.	MOINS de **15** jours après la dernière inoculation.	PLUS de **15** jours après la dernière inoculation.	GLOBALE	RÉDUITE
Catégorie A.	1.387	7,6	7	4	8	1,37	0,58
Catégorie B.	8.017	44,1	29	29	42	1,25	0,53
Catégorie C.	8.779	48,3	24	30	55	1,24	0,63
Mordus par des chiens	15.765	86,7	26	43	81	0,95	0,52
Mordus par des chats.	1.298	7,1	—	3	2	0,38	0,15
Mordus par des loups	600	3,3	34	17	22	12,17	4,01
Mordus par d'autres animaux.	520	2,9	—	—	—	—	—
Morsures à la tête et au visage	2.244	12.3	54	35	53	6,33	2,46
Morsures aux membres supérieurs	10.552	58,0	6	23	44	0,69	0,42
Morsures aux membres inférieurs et au tronc	4.590	25,3	—	4	6	0,22	0,13
Morsures multiples sur divers points du corps	797	4,4	—	1	2	0,33	0,25
Totaux.	18.483	100,0	60	63	105	1,25	0,58

facile de se convaincre que, dans la plupart des cas (les deux tiers au minimum), l'animal mordeur était atteint de rage. Nous voyons, en effet, que la mortalité pour la catégorie C, est à peu près la même que pour les deux autres catégories, et la mortalité réduite pour cette catégorie est même supérieure à la mortalité générale.

219 fois seulement sur 228 cas, la période d'incubation de la rage a pu être déterminée.

Ces 219 cas, d'après la durée d'incubation, se répartissent de la façon suivante :

DURÉE D'INCUBATION	Moins de 20 jours.	De 20 à 40 jours.	De 40 à 60 jours.	De 60 à 80 jours.	De 80 à 100 jours.	De 100 à 200 jours.	Au delà de 200 jours.
Nombre des cas.	21	106	46	17	5	15	9
p. 100	9,6	48,4	21,0	7,8	2,3	6,8	4,1

A l'inspection de ce tableau, on remarque que le plus souvent (48 p. 100 de cas) la rage se déclare dans la période de vingt à quarante jours après la morsure ; 79 p. 100 des malades sont pris de rage dans les premiers soixante jours après la morsure.

La période d'incubation minima de treize jours fut observée une fois ; de quatorze jours — deux fois. Dans 3 cas seulement, la période d'incubation a duré plus d'un an.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE AOUT 1912 N° 8

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE DE LA VIEILLESSE

par A. T. SALIMBENI et Louis GERY.

(Avec les Pl. XIV à XVI.)

Grâce aux travaux de Metchnikoff et de son école, l'étude scientifique de la vieillesse, trop négligée jusqu'à ces dernières années par les biologistes et les médecins, est, en ce moment, à l'ordre du jour. Le nombre des faits précis déjà réunis sur cette importante question nous permet d'espérer qu'on arrivera à élucider un jour la pathogénie de la déchéance sénile. Cette pathogénie, en effet, est loin d'être évidente; le temps unique facteur de vieillesse, ce n'est pas une explication plus satisfaisante pour l'esprit du clinicien que pour celui du philosophe; l'observation montre tous les jours que le degré de sénilité ne se peut nullement mesurer à l'âge du sujet. Tel qu'il a été posé par Metchnikoff, le problème de la vieillesse doit être envisagé et poursuivi par la double voie, si féconde en médecine, de l'étude anatomo-clinique et expérimentale : étude des lésions spontanées chez les vieux sujets, d'une part; d'autre part, étude des lésions expérimentales provoquées par les divers facteurs capables d'affaiblir l'organisme et de produire la déchéance sénile, en précipitant l'action du temps.

A l'heure actuelle, la partie expérimentale de l'étude de la vieillesse est peut-être poussée plus loin que l'étude anatomique; l'on a pu reproduire chez l'animal des lésions qui sont l'apa-

nage et peuvent être considérées comme la cause de la sénilité : Metchnikoff (1) a montré que l'athérome aortique, la cirrhose du foie, la néphrite interstitielle chronique peuvent être déterminés chez les animaux par l'ingestion de petites doses journalières de paracrésol continuées pendant des mois. Okhubo (2) et plus tard Dratchinsky (3) ont produit des lésions organiques très prononcées et rappelant de très près celles que l'on rencontre dans les organes des vieillards, en faisant ingérer à des lapins, cobayes et macaques de petites doses d'indol. Bref, il semble bien que les substances de la série aromatique, formées constamment dans l'intestin, agissent comme des poisons lents capables de provoquer des lésions que l'on rencontre dans la vieillesse.

L'étude anatomo-pathologique des lésions trouvées chez les sujets âgés, au contraire, a été rarement entreprise, et nous ne connaissons que des examens partiels. Il est en effet assez rare de pouvoir faire dans de bonnes conditions l'autopsie d'un sujet très âgé. L'occasion s'étant présentée de l'examen complet et précoce d'une femme de quatre-vingt-treize ans, indemne de tares organiques, M. Metchnikoff a bien voulu nous confier cette tâche.

*
* *

Cette femme, Ivana St..., Serbe d'origine, était dans un excellent état quand, en juin 1909, toute sa famille émigra en Amérique et l'emmena avec elle. La Commission américaine d'immigration accepta tous les membres de la famille; elle seule fut refusée comme « undesirable » du fait de son grand âge. Ses parents durent l'abandonner; elle repassa l'Océan et la Compagnie transatlantique la débarqua au Havre. Pendant le retour, la pauvre vieille était devenue folle, alors que, jusqu'à ce moment, elle jouissait, paraît-il, de facultés intellectuelles suffisantes. Le directeur de l'hospice du Havre écrivit à M. Mechtnikoff, sachant que ce dernier poursuivait des études sur la vieillesse. Elle arrive à l'hôpital Pasteur, le 6 août 1909.

Elle est atteinte d'un délire d'angoisse ; elle passe des heures

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1910.
(2) *In* Metchnikoff, *loc. cit.*
(3) *Annales de l'Institut Pasteur*, juin 1912.

entières à crier et à chanter sur un ton de mélopée. Elle parle un dialecte slave et il fut assez difficile de trouver un interprète. Elle appelle sa « maman » ; elle s'adresse à ses enfants, leur reproche de l'avoir emmenée si loin, elle si vieille ; une phrase revient souvent : « Pourquoi m'avez-vous laissée si seule dans la nuit? » Souvent elle est fort agitée, elle se lève, lacère sa chemise, cherche à mordre et à griffer les personnes qui l'approchent.



Son état d'agitation empêcha de la garder à l'hôpital Pasteur, et le 11 août on dut l'envoyer à l'hospice Sainte-Anne, dans le service du Dr Dagonnet.

Elle se calme alors peu à peu et son agitation tombe, la débilité mentale persistant toujours. L'agitation reparut vers la fin de janvier 1910 et elle mourait le 1er février vers midi, après trente-six heures de maladie aiguë.

L'autopsie fut pratiquée le même jour à 3 h. 45 du soir.

Le cadavre est celui d'une vieille femme de squelette normalement développé. La peau est très ridée sur la face et le cou, légèrement sur le reste du corps. Elle est épaissie, hyperkératosique sur la partie antérieure du thorax. Le front porte deux petites taches café au lait irrégulières; des éphélides nombreuses parsèment le visage, des taches de purpura sénile le dos

des mains et des pieds; il existe de l'intertrigo. Les cheveux, complètement blancs, fins, un peu clairsemés, ont une longueur d'environ 10 centimètres. Les sourcils, gris jaunâtre, sont un peu raréfiés; la lèvre supérieure présente une légère hypertrichose. Les aisselles sont glabres. A la partie inférieure de la région pubienne et sur les grandes lèvres, il n'y a que quelques rares poils gris, très longs.

La graisse sous-cutanée est atrophiée. Les ganglions inguinaux, hypertrophiés, font saillie sous la peau. Un peu d'œdème gonfle les extrémités inférieures. Les glandes mammaires sont atrophiées et pendantes. Un gros mamelon surnuméraire, bien formé, existe un peu en dehors de la ligne parasternale gauche, sur la 7[e] côte.

Il ne reste plus qu'une dent, l'incisive supérieure latérale droite.

Les orifices naturels sont normaux, à l'exception de l'anus porteur d'un bourrelet hémorroïdaire assez volumineux.

A l'ouverture du cadavre, les organes apparaissent dans leurs rapports normaux. Les anses intestinales, dilatées, ne sont pas recouvertes par l'épiploon, qui est très réduit et pauvre de graisse. Le niveau du diaphragme remonte, à droite, au 4[e] espace; à gauche, au bord inférieur de la 5[e] côte. Les articulations sterno-claviculaires sont normales, les cartilages costaux sont calcifiés, mais faciles à couper. Les côtes, atteintes d'ostéoporose, sont fragiles.

Les poumons, emphysémateux, ne s'affaissent pas comme il est normal à l'ouverture du thorax et recouvrent en grande partie l'aire cardiaque. L'anthracose est peu marquée. Le poumon gauche est complètement libre dans la cavité pleurale; le droit est au contraire réuni à la paroi par des adhérences faciles à rompre sur toute la hauteur des lobes moyen et inférieur. La face interne de ce poumon adhère au péricarde. Le sac péricardique est indemne d'adhérences et d'exsudation.

A l'examen, les différents organes se sont présentés à nous dans l'état suivant :

Les *amygdales* sont petites.

Le *larynx* a ses cartilages calcifiés ainsi que les anneaux de la *trachée*.

Le *corps thyroïde*, volumineux, pèse 42 grammes; son aspect est normal, peut-être un peu plus pâle que normalement sur la plus grande étendue de sa surface. Dans la partie droite de l'isthme on trouve une tumeur arrondie aplatie, du diamètre d'une petite mandarine. A la coupe, elle se présente avec un aspect blanchâtre, assez ferme et enfermant des kystes à contenu colloïde et à contours irréguliers.

Le *poumon gauche* (275 grammes) présente des adhérences interlobaires anciennes. Les ganglions du hile, anthracosés, sont hypertrophiés. Le poumon est fortement emphysémateux, surtout aux bords et au sommet. A la coupe, on ne trouve pas d'autre lésion qu'un certain épaississement des bronches.

Le *poumon droit* (675 grammes) est fortement augmenté de volume, surtout dans son lobe inférieur. Ce dernier est recouvert sur toute sa hauteur par des fausses membranes fibrino-purulentes jaunâtres; on trouve des adhérences analogues au niveau des scissures interlobaires. La coupe révèle dans le lobe inférieur la présence d'un gros bloc de gangrène pulmonaire à forme pneumonique, caractérisée par une coloration foncée, brun violacé, semée de taches irrégulières jaunâtres, et une odeur assez fétide. La surface de coupe est assez sèche. Les fragments détachés sont moins denses que l'eau.

Le *cœur* pèse, entier, 350 grammes et, débarrassé de ses caillots, 295 grammes.

Son diamètre transversal est de 9 centimètres. Il mesure 8 cent. 5 de la pointe à l'origine de l'aorte. La pointe est exclusivement formée par le ventricule gauche. Le myocarde, de consistance normale, est légèrement brunâtre. Le péricarde est lisse, avec une grosse tache laiteuse sur la face antérieure du ventricule droit et une graisse sous-épicardique légèrement augmentée. L'endocarde est un peu épaissi et nacré.

Les orifices et valvules du cœur droit sont normaux; l'artère pulmonaire mesure 7 centimètres au-dessus des valvules sigmoïdes. La suffisance des valvules paraît parfaite. Dans le cœur gauche, les valvules paraissent également suffisantes; la valve aortique de la mitrale présente un athérome assez marqué surtout au niveau des bords libre et adhérent. Les sigmoïdes aortiques présentent de petites taches athéromateuses des bords adhérents. La crosse de l'aorte, ectasiée (circonférence maxima = 11 cent. 5), présente de nombreuses pustules et ulcérations athéromateuses; mais on trouve cependant, surtout dans la portion ascendante, de nombreux espaces lisses et non athéromateux. Dans son trajet thoracique abdominal, l'aorte est atteinte d'un athérome plus marqué et répond au type de « l'aorte pavée ».

Le *foie* pèse 1.455 grammes. Il mesure dans son diamètre transversal 26 centimètres, dans son diamètre vertical 8 centimètres et 16 centimètres dans le sens antéro-postérieur. La capsule de Glisson est lisse et légèrement épaissie au niveau du bord antérieur du lobe droit. La vésicule biliaire contient une bile normale de quantité et de coloration. Le parenchyme hépatique, à la coupe, apparaît ferme et un peu pâle.

La *rate* (95 grammes, diamètres = 9 × 7 × 2,5 centimètres) est entourée d'une gangue de périsplénite adhésive. Sa pulpe est ferme et présente de minimes hémorragies.

Le *pancréas* (45 grammes) est macroscopiquement normal.

Le *rein gauche* (140 grammes, diamètres = 11 × 5 × 2,5 centimètres) est de surface lisse, de décortication facile. A la coupe, si la graisse centrale est un peu augmentée, la corticale a une épaisseur tout à fait normale et ne paraît présenter aucune lésion.

Le *rein droit* (135 grammes) est tout à fait semblable au gauche, mis à part un certain degré de pâleur.

Les *surrénales* sont volumineuses (la droite pèse 12 grammes) avec des adénomes multiples.

L'*intestin* est fortement météorisé surtout au niveau des côlons. L'anse sigmoïde, très longue, se loge sous la coupole diaphragmatique. L'appendice, long de 9 centimètres, est mince, régulier, rectiligne.

Le *crâne*, normal par sa table externe, est, sur sa table interne, sculpté par les sillons naturels très exagérés, surtout celui de la méningée moyenne; il est très mince et transparent au niveau des granulations de Pacchioni. D'une manière générale les deux tables interne et externe sont papyracées et séparées par un diploë plus celluleux et moins rouge que normalement.

La *dure-mère* adhère au crâne dans la région frontale. Elle est peu tendue, opaque, épaisse; elle est libre d'adhérences sur sa face interne. La méninge molle est un peu épaisse.

Le liquide céphalo-rachidien est normal d'aspect et de quantité.

Le *cerveau* (1.090 grammes) a ses circonvolutions très atrophiées surtout au niveau du lobe frontal. Les artères de la base et les sylviennes présentent toutes des lésions d'athérome. Les ventricules latéraux sont dilatés. La substance grise, nettement diminuée d'épaisseur, est pâle. Il n'existe aucune lésion en foyers ou lacunaire.

La *moelle épinière* est molle.
L'ostéoporose est manifeste au niveau du tissu spongieux des *os*.
La *moelle diaphysaire* est abondante, jaune, très grasse.

ÉTUDE HISTOLOGIQUE

I. — Appareil respiratoire.

Larynx. — L'examen du larynx ne nous a permis d'y découvrir que des lésions minimes ou, sans doute, contingentes.

L'épithélium et les glandes de la muqueuse nous ont semblé normaux sur toute l'étendue de la coupe. A signaler la présence, dans le chorion de la muqueuse de la corde vocale supérieure, d'un petit kyste gros comme une tête d'épingle, revêtu d'un épithélium à deux ou trois assises de cellules cylindriques et à contenu amorphe.

Les cartilages thyroïde et cricoïde présentent une calcification assez marquée, mais beaucoup moins intense que celle à laquelle on était en droit de s'attendre, surtout étant données les lésions de cet ordre que l'on rencontre au niveau de certains cartilages des bronches.

Poumon. — Le parenchyme pulmonaire présente deux régions très distinctes à considérer : 1° le parenchyme ne présentant pas de lésions aiguës ; 2° le foyer de gangrène.

Sur cette dernière nous serons brefs ; il ne s'agit là que d'un phénomène surajouté, n'ayant rien à faire dans cette étude. De vastes étendues de poumon sont nécrosées, mais nulle part il n'existe de fonte du parenchyme : les alvéoles sont parfaitement reconnaissables à leurs contours, mais il n'existe presque plus de noyaux colorables, tout est acidophile ; sur les bords de la lésion on trouve des noyaux faiblement teintés d'une manière uniforme par les colorants basiques ; ils sont en caryolyse. Beaucoup d'alvéoles sont remplies par une substance grenue, avec des cellules encore reconnaissables bien que le noyau ait disparu ; quelques-unes contiennent du pigment ocre et des particules de charbon. Souvent le contenu alvéolaire est constitué par un réseau fibrineux très net. Les vaisseaux se sont thrombosés avant de se nécroser.

A la limite du foyer de nécrose, on trouve une hépatisation très nette, le passage se faisant sans transition d'une lésion à l'autre. Les alvéoles sont comblées par un réseau fibrineux très marqué avec de nombreux polynucléaires et des cellules endothéliales tuméfiées. Les bronches présentent des lésions assez peu marquées et banales, sauf lorsqu'elles se trouvent en plein foyer gangréneux. Les vaisseaux présentent parfois de l'endovascularite, mais le fait est loin d'être constant.

Dans le parenchyme épargné par la gangrène, il existe un emphysème très marqué ; les parois alvéolaires sont très minces, souvent rompues, les alvéoles communiquent largement entre elles, formant de très grosses vésicules qui compriment et aplatissent les alvéoles voisines. Les alvéoles dilatées se continuent directement avec les bronchioles ; on retrouve de l'épithélium bronchique appliqué directement sur certaines de ces vésicules. Au niveau des grosses bronches, les îlots cartilagineux présentent presque tous de la calcification centrale ; quelquefois cette calcification s'accompagne de la désintégration du cartilage et une petite cavité se creuse dans ce dernier.

Les artères peuvent présenter des lésions assez légères d'endartérite chronique ; le tissu conjonctif périvasculaire est un peu augmenté ; il semble que le tissu interlobulaire le soit également.

L'anthracose est marquée, les grains de charbon étant soit macrophagocytés, soit libres dans le tissu conjonctif. Mais elle ne dépasse pas en intensité celle que l'on rencontre constamment chez les adultes.

II. — Système circulatoire central.

Cœur. — Le myocarde présente des lésions de sclérose très nettes et intenses au sommet des piliers de premier ordre, légères dans le reste.

Au sommet des colonnes charnues, on constate la présence de véritables bandes scléreuses, formées de fibres de collagène très tassées. Les bandes peuvent avoir trois ou quatre fois le diamètre d'une fibre musculaire, mais elles sont, en général, assez courtes. Parallèles dans leur ensemble aux fibres musculaires, ces bandes forment un réseau à mailles allongées assez

inégales, comprenant le plus souvent une seule fibre mais pouvant en comprendre plusieurs. Cette sclérose intense cesse assez rapidement et n'occupe guère que la pointe du pilier; mais elle a une certaine tendance à s'étendre et à gagner la gaine des vaisseaux situés plus bas. A ce niveau, les fibres musculaires paraissent un peu plus étroites. Dans le reste du myocarde, la sclérose est bien moins intense et exclusivement localisée au voisinage immédiat des vaisseaux. Ceux-ci présentent pour la plupart des gaines de tissu scléreux très épaisses, dans lequel on rencontre quelques rares macrophages et fibroblastes, ayant tendance à dissocier les fibres, mais seulement sur une petite étendue ; à peu de distance des vaisseaux, elles reparaissent normales, serrées les unes contre les autres ou entrecoupées de travées fibreuses plus ou moins épaisses.

Même dans la profondeur du myocarde les travées interfasciculaires sont plus épaisses que normalement ; le tissu interstitiel intrafasciculaire paraît, sauf exceptions déjà signalées, sensiblement normal.

Les fibres musculaires sont sensiblement normales ; il n'y a pas de dégénérescence graisseuse, la striation est assez bien visible, les champs de Conheim sont également très apparents.

La seule lésion qu'on puisse relever est, sur les coupes transversales, une inégalité de diamètre entre les fibres qui ne semble pas attribuable à l'inégalité normale et doit être rattachée, croyons-nous, à une atrophie soit volumétrique, soit due à la division longitudinale. On ne voit cependant pas sur les coupes longitudinales aucune figure de division en train de se produire.

L'endothélium au niveau des ventricules et des valvules est, sur de grandes étendues, doublé d'une couche plus ou moins épaisse de tissu conjonctif, d'aspect adulte, pauvre en cellules mais assez lâche.

Aorte. — L'aorte, en dehors des régions athéromateuses, est relativement saine. Elle ne présente pas, notamment, de lésions anciennes. En revanche, il y a des lésions très nettes d'endo- et de périartérite, mais ces lésions paraissent assez récentes et l'on peut être en droit de les considérer comme subaiguës.

Sur la moitié postérieure de la circonférence de l'aorte,

l'endartère présente ces lésions d'une manière continue : il existe une couche de cellules couvrant l'endartère et n'envahissant pas la tunique moyenne sur les bords de la lésion. Elle n'en dissocie que les lames les plus internes, dans les points où la lésion est plus marquée.

Cytologiquement, ce sont surtout des cellules de la série lymphoïde qui composent cette inflammation : en grande majorité ce sont de moyens et de grands mononucléaires mêlés de quelques fibroblastes en réaction, quelquefois bi-nucléés ; les lymphocytes y sont rares, les polynucléaires exceptionnels. L'endothélium ne se retrouve que par places, sous forme de cellules tuméfiées.

Dans le tissu conjonctif périartériel, on trouve des lésions inflammatoires composées des mêmes éléments, à cette différence près que la réaction fibroblastique y est un peu plus accentuée. Mais les lésions ici ont une répartition un peu différente : on les retrouve bien sur la moitié postérieure de l'aorte, où le tissu cellulo-adipeux est plus abondant, mais elles ne forment plus une nappe continue : les cellules se disposent en amas allongés dans le sens des fibres du tissu conjonctif, ces amas étant plus gros et plus tassés au voisinage immédiat de l'artère mais pouvant se trouver à tous les niveaux de la gaine cellulaire périaortique. Ils sont de dimensions très variables et l'on peut également rencontrer des cellules diapédétiques disséminées. Les vaisseaux ne paraissent jouer aucun rôle dans la réglementation de la topographie des lésions inflammatoires ; ils sont congestionnés.

En profondeur, l'inflammation n'est pas aussi limitée que du côté interne de la paroi aortique, et on peut en retrouver des traces sur le quart externe à peu près de son épaisseur ; par places les lamelles élastico-musculaires sont dissociées par des cellules diapédétiques de même nature que précédemment et des globules rouges (Pl. XIV, fig. 1).

Artère pulmonaire. — L'artère pulmonaire nous a paru normale, sauf dans la zone où elle est accolée à l'aorte ; sa tunique péri-artérielle participe alors aux lésions de la tunique péri-artérielle de l'aorte.

III. — Organes lymphoïdes.

Rate. — La rate est sans doute un des organes qui présentent les lésions les plus grosses et les plus manifestes.

A un faible grossissement, son parenchyme apparaît pâle, pauvre en cellules ; les corpuscules de Malpighi sont rares, ceux qui restent sont extrêmement réduits ; les travées conjonctives et les gaines vasculaires sont épaissies ; les grosses artères ont leur tunique interne doublée d'un tissu conjonctif néoformé ; à ces lésions vient s'ajouter par places une forte congestion des sinus.

Au point de vue cytologique, le réticulum est beaucoup plus visible que normalement et les cellules fusiformes semblent augmentées de nombre. A la sclérose interstitielle s'ajoute de la sclérose pulpaire.

Moyens et grands mononucléaires à protoplasma souvent très acidophile et à noyau assez clair forment la grande majorité des cellules qui composent la pulpe de la rate, les moyens prédominant un peu sur les grands. On y rencontre aussi des polynucléaires relativement non rares.

Cette particularité, jointe à la rareté relative des cellules, donne à la pulpe cet aspect clair que n'a pas la rate de l'adulte.

Quelquefois, plutôt rarement, on trouve au voisinage d'une artériole un tassement plus marqué de cellules formant au vaisseau un mince manchon le plus souvent très incomplet et constituant un reste minime de corpuscule de Malpighi : c'est à peu près tout ce qui persiste de pulpe blanche. Au niveau de ces îlots, les cellules paraissent plus jeunes et beaucoup d'entre elles ont un protoplasma basophile et un noyau riche en chromatine. Les lymphocytes y sont assez nombreux alors qu'ils sont presque exceptionnels ailleurs.

Le pigment n'est pas augmenté de quantité ; peut-être même pourrait-on dire qu'il est moins abondant que normalement si l'on avait sur cette question un point de comparaison précis.

Les travées et les gaines vasculaires sont épaisses, elles sont constituées par du tissu fibreux, adulte, les fibres néoformées se continuant sans distinction avec les fibres primitives. Beaucoup d'artères, surtout parmi les moyennes, ont leur limitante

interne doublée d'une couche plus ou moins considérable de substance hyaline, fortement acidophile, ne donnant pas les réactions du collagène. Cet état peut aller exceptionnellement jusqu'à l'oblitération.

Dans la gaine de certaines artères de calibre moyen, on rencontre parfois des macrophages isolés ou réunis en îlots de trois à quatre. Assez souvent on peut trouver de l'athérome.

La congestion que nous avons signalée en passant est parcellaire ; elle n'occupe que certaines parties de l'étendue de la préparation. Par places, il ne semble pas que ce ne soit pas seulement de congestion qu'il s'agisse, mais que la paroi du sinus ait été rompue et que le sang ait dissocié les cordons de Billroth (Pl. XV, fig. 11).

Ajoutons enfin que dans un point limité du bord de la rate, la capsule très plissée se rapproche de celle de la face opposée et que l'espace qui les sépare est à peu près privé de pulpe, presque réduit aux travées conjonctives et aux vaisseaux ; ceux-ci, très épaissis, ont une gaine conjonctive présentant au maximum la dégénérescence hyaline que nous avons décrite au niveau de la tunique interne des autres artères.

Ganglions lymphatiques. — Les ganglions lymphatiques examinés histologiquement présentent une grosse sclérose hilaire, de la sclérose interstitielle et une disparition des cordons folliculaires avec persistance des corpuscules de Malpighi.

La sclérose hilaire est importante; en certains points, le ganglion est uniquement composé de tissu de sclérose sur la moitié de la surface; ce tissu est composé de fibres de collagène adulte parallèles entre elles, ondulées, assez grêles, mais serrées les unes contre les autres. On trouve entre les fibres de nombreuses cellules lymphoïdes, témoins de l'existence antécédente de tissu adénoïde à cette place; ces cellules sont tantôt dispersées dans le tissu scléreux, tantôt agminées, disposant des îlots arrondis de tissu adénoïde dans des logettes ménagées dans le tissu scléreux. Ces logettes ne dessinent pas des espaces strictement limités; les cellules diffusent peu à peu, sans limites nettes, dans le tissu de sclérose avoisinant. On trouve de nombreux vaisseaux dans le tissu de sclérose; souvent on les voit entourés de fibres conjonctives, mais il

n'apparaît pas nettement que ce soit eux qui aient commandé la topographie des lésions scléreuses.

Le squelette conjonctif du ganglion est très développé : la capsule d'enveloppe est épaisse; de fortes travées en partent pour rejoindre le tissu de sclérose hilaire. Les vaisseaux qui les parcourent ne présentent pas, en général, de lésions bien nettes; cependant, on rencontre, disséminés dans le tissu adénoïde, de petits corps scléreux formés de fibres concentriques qui paraissent bien être de petits vaisseaux oblitérés.

La substance propre du ganglion a subi des modifications très nettes qui lui donnent, au premier abord, le même aspect qu'à la rate de notre malade : le tissu adénoïde tend à prendre un aspect partout uniforme. Ici, les cordons folliculaires ne sont plus reconnaissables; les follicules clos persistent, mais ils sont moins nombreux et paraissent plus petits que normalement.

Examinée à un fort grossissement, la pulpe ganglionnaire est exclusivement formée de cellules lymphoïdes, les lymphocytes y étant l'exception; on constate une abondance considérable de macrophages, quelques-uns contenant du pigment ocre. Beaucoup de cellules ont un protoplasme très acidophile; quelques-unes un noyau pycnotique.

Au niveau des follicules clos, les lymphocytes deviennent la majorité. Le centre germinatif n'existe pas; dans un grand nombre des formations folliculaires, le centre présente une sclérose très nette, avec fibres de collagène colorable par le Van Gieson; souvent aussi, on y trouve un grand nombre de cellules altérées, à noyau pycnotique, plus rarement en caryorrhexie, et même des grains de chromatine épars.

L'hypoplasie des organes lymphoïdes, pour si manifeste qu'elle soit, n'est pourtant pas une aplasie absolue : Nous avons pu trouver dans nos coupes plusieurs figures de karyokinèse, bien qu'elles soient très rares (V. pl. XIV, fig. 4).

Amygdales. — Les amygdales présentent des zones étendues de tissu adénoïde paraissant normal à première vue. Cependant, à un grossissement un peu fort, on constate que beaucoup de centres germinatifs sont scléreux, les fibroblastes constituant leur presque totalité. Le reste du tissu adénoïde nous a semblé normal. Entre ces zones de tissu adénoïde, on trouve des plages

étendues de tissu fibreux dense contenant par places, surtout autour des culs-de-sac des cryptes, du tissu adénoïde plus ou moins sclérosé. Entre les fibres de ce tissu, on trouve d'assez nombreuses cellules lymphoïdes, notamment beaucoup de macrophages.

L'épithélium est sensiblement normal ; à signaler cependant que les cellules en migration entre les cellules épithéliales sont très rares.

Intestin. — L'intestin, dans ses divers segments, semble présenter un certain degré d'atrophie de la muqueuse ; les glandes y sont, semble-t-il, diminuées de nombre et de longueur. Au niveau de l'iléon, les follicules clos sont très réduits de dimensions ; ils ont perdu leur aspect folliculaire; les centres germinatifs ne sont pas appréciables, les limites sont indécises et le tissu adénoïde se perd peu à peu dans le chorion avoisinant, lui-même très infiltré, mais pas plus, semble-t-il, qu'à l'état normal. La *muscularis mucosæ* est fréquemment segmentée par du tissu fibreux, la sous-muqueuse légèrement sclérosée.

L'*appendice* (Pl. XVI, fig. 15) semble ne présenter d'autre lésion qu'une sclérose très appréciable de la sous-muqueuse. Les follicules clos paraissent sensiblement normaux comme nombre et comme développement ; cependant, là non plus, ne voit-on pas de centres germinatifs.

IV. — Organes glandulaires.

Foie. — A un faible grossissement, on ne remarque qu'un certain degré de congestion sus-hépatique et une infiltration modérée des espaces de Kiernan. Toute la zone péri-sus-hépatique a ses capillaires distendus et remplis par le sang ; ils sont beaucoup plus larges que dans la zone périportale. Cependant, la travée hépatique elle-même est bien conservée et ne présente aucune des lésions qu'on trouve dans le foie cardiaque ; pas d'atrophie appréciable, pas de dégénérescence graisseuse.

Les cellules hépatiques apparaissent comme très sensiblement normales de taille et d'aspect ; le plus souvent homogènes et finement granuleuses, on en rencontre parfois, soit isolées, soit par petits groupes, ayant un protoplasma tout à fait clair.

Les noyaux sont très fréquemment gros, comme hydro-

piques ; quelques éléments sont binucléés. Les formes de dégénérescence nucléaire sont exceptionnelles. De loin en loin, on rencontre au bord des travées ou dans les capillaires des blocs très acidophiles un peu plus petits qu'une cellule hépatique ; tantôt ils sont nucléés, tantôt et plus souvent ne présentent aucune trace de noyau. Il nous semble que l'on doive les considérer comme des cellules vieillies, dégénérées et en voie de disparition. Les cellules hépatiques sont très fréquemment chargées de granulations jaunâtres ayant toute l'apparence du pigment ocre.

Les cellules de Kuppfer sont en état de réaction marquée. Les espaces portes nous ont paru de dimensions sensiblement normales et ne présentent pas de modifications scléreuses bien accusées. A leur niveau existe, par contre, une infiltration modérée composée presque exclusivement de moyens mononucléaires et de lymphocytes. On remarque enfin que la paroi conjonctive des veines sus-hépatiques est un peu épaissie et infiltrée de cellules rondes de la série lymphoïde. Au niveau des artères hépatiques, on remarque des figures de périartérite caractérisées par une augmentation du tissu conjonctif et une infiltration de cellules lymphoïdes.

Reins. — D'une façon générale, les reins, au niveau de la corticale, ne présentent de lésions scléreuses que d'une façon parcellaire. Par places, sous la capsule, autour d'un glomérule, autour d'un tube, autour d'une artère, on voit une surabondance de tissu fibreux ; mais cet excès reste limité comme étendue et comme degrés. La surface du rein n'est pas régulière ; de loin en loin on voit une dépression cicatricielle d'où part une traînée de tissu conjonctif s'enfonçant vers la médullaire. Le tissu conjonctif est d'ordinaire adulte et fibreux ; mais on trouve également quelques foyers d'infiltration embryonnaire assez discrète dont les éléments sont des cellules lymphatiques, pour la plupart des moyens mononucléaires mêlés à des fibroblastes.

Les foyers peuvent se trouver à n'importe quel niveau, sans élection bien nette ; ils semblent cependant avoir une prédilection pour les zones les plus voisines de la capsule et le long des vaisseaux (Pl. XV, fig. 7).

Au niveau de la médullaire, le tissu conjonctif entourant

chaque tube droit est abondant et constitué par du tissu fibreux adulte.

On peut dire cependant que le rein a été relativement peu atteint par le processus scléreux, car des étendues notables de parenchyme sécréteur apparaissent sensiblement normales, chaque tube étant entouré seulement d'une unique fibre de collagène.

D'assez nombreux glomérules présentent des lésions scléreuses diverses ; lésions scléreuses légères du bouquet glomérulaire, sclérose plus ou moins intense péricapsulaire ; quelques-uns, complètement réduits à un bloc de collagène, sont en « pains à cacheter ». On les trouve de préférence au niveau des points de néphrite interstitielle parcellaire, mais on en peut rencontrer en des endroits où le parenchyme avoisinant apparaît sensiblement sain. D'autres glomérules semblent, par contre, légèrement augmentés de volume et gorgés de sang.

L'épithélium des tubes tant sécréteurs qu'excréteurs ne présente pas de lésions bien nettes. D'une façon générale il paraît assez bas ; la lumière des tubes contient une substance acidophile granuleuse sans qu'il soit question de véritables cylindres. Un certain nombre de cellules sont desquamées, d'autres plus acidophiles que normalement. En partie tout au moins, ces modifications peuvent être mises sur le compte des fixateurs et de la cadavérisation.

Du côté des vaisseaux on note d'abord une congestion par places intense, portant sur les artères, les veines, les capillaires, pouvant s'accompagner de suffusions hémorragiques dans le tissu interstitiel, dans les tubes voisins, mais l'hémorragie reste toujours limitée au voisinage du vaisseau.

Certaines artères présentent des lésions d'endartérite et de périartérite plus ou moins intenses et paraissant anciennes, la tunique musculaire est dans la plupart des cas assez bien conservée et dans bon nombre d'artères les lésions sont peu avancées.

Pancréas. — Le pancréas présente une légère sclérose interlobulaire généralisée à peu près à tout l'organe ; le tissu conjonctif interlobulaire est un peu plus abondant que normalement ; il reste lâche et non scléreux.

De plus, de place en place, on trouve un lobule présentant

un certain degré de sclérose interacineuse. Cette sclérose est toujours assez peu marquée; elle ne donne pas l'impression d'être très ancienne; elle est composée de nombreuses cellules fusiformes et de fibres de collagène, fibres grêles et espacées. Cette sclérose n'est pas régie par une topographie fixe, parfois elle est centrée par un canal excréteur, parfois elle semble être l'expansion de la sclérose interlobulaire, mais souvent aussi elle existe en dehors de ces deux causes.

Les cellules nobles du pancréas sont à peu près normales; les acini ont leur aspect et leurs dimensions normales. Ils sont cependant plus petits dans les points où la sclérose interacineuse atteint une certaine intensité ; en ces points, la sclérose s'accompagne d'un peu d'atrophie.

Certains acini présentent des cellules, surtout parmi les cellules centro-acineuses, qui présentent une dégénérescence particulière: l'ergastoplasme disparaît, le protoplasme devient très fortement éosinophile. A un degré plus avancé, le protoplasme pâlit et se creuse de vacuoles; le noyau paraît rester normal aussi longtemps que l'on peut reconnaître la cellule. Ce mode de dégénérescence paraît être tout à fait indépendant de la sclérose et l'on trouve des acini très nettement dégénérés dans les points les moins scléreux.

Les îlots de Langherans nous ont paru normaux de nombre, de dimension et d'aspect.

Les canaux excréteurs sont en général limités par une couche épaisse de tissu fibreux dense. Quelques-uns ont leur épithélium desquamé et un peu de réaction conjonctive de la partie interne de la paroi.

Les vaisseaux sont en général normaux.

L'artère splénique est athéromateuse à un degré léger mais net.

Glandes salivaires. — La *parotide* présente une sclérose peu marquée et adulte des espaces interlobulaires, sclérose centrée indifféremment par les vaisseaux ou les gros canaux excréteurs. Ce n'est qu'exceptionnellement que, de cette sclérose, part une ébauche de sclérose interacineuse.

Les acini nous ont paru tout à fait sains et en parfait état de sécrétion.

Quant aux vaisseaux, en dehors de la sclérose périvasculaire

déjà notée, ils présentent, les artères du moins, un certain degré d'inflammation chronique de la couche interne.

La *sous-maxillaire* ne présente que des lésions vasculaires chroniques et un peu de sclérose autour de certains gros canaux excréteurs.

Mamelles. — Les mamelles sont constituées pour leur plus grande partie par un tissu scléreux formé de fibres de collagène denses et tassées et très pauvre en cellules. Dans cette masse, on trouve de loin en loin des tubes glandulaires, soit unis par petits groupes pour constituer des acini atrophiques, soit complètement isolés et perdus dans la sclérose avoisinante. Dans un sein, quelques-uns de ces tubes sont le siège d'une ébauche de dilatation; dans l'autre, plusieurs constituent des microkystes arrondis parfaitement nets; leur lumière est vide ou bien contient une matière amorphe, acidophile et grenue (Pl. XVI, fig. 19).

L'épithélium ne paraît présenter aucune modification au niveau des kystes non ou peu dilatés. C'est un épithélium cubique bistratifié à protoplasme assez foncé. Il tend à devenir pavimenteux, restant toujours bistratifié, à mesure que l'état kystique s'accentue.

Dans un des seins, celui où les formations microkystiques sont nettes, nous avons relevé au niveau de deux tubes glandulaires immédiatement voisins des modifications intéressantes, deux autres tubes faisant partie du même acini restant normaux. Ces deux tubes sont très augmentés de volume dans leur ensemble. L'un d'eux présente un contour très irrégulier, festonné. L'épithélium est très proliféré ; le nombre des couches qui le composent est variable suivant les points. Tantôt on en compte quatre ou cinq et tantôt une dizaine au moins, si bien que la lumière est bien plus irrégulière que le contour extérieur, elle est comme effilochée. Les cellules sont de taille sensiblement égale à celles d'un tube normal, ayant une tendance à être prismatiques. La plupart ont un protoplasme foncé, de mêmes réactions colorantes que celles de la couche interne des tubes normaux; mais on en trouve mêlées aux précédentes qui ont un protoplasme clair. Toutes ces cellules sont égales entre elles; on ne constate ni karyokinèses ni monstruosités cellulaires. La lumière montre des cellules desquamées plus ou moins altérées.

L'autre tube anormal est modifié d'une façon toute différente. Ici, le nombre des couches cellulaires est moins considérable, quatre au plus, mais l'aspect des cellules est beaucoup plus différent de l'état normal. Ce sont de grandes cellules prismatiques à protoplasme homogène, fortement grenu, un peu acidophile, à noyau basal. Leur extrémité libre fait saillie dans la lumière du tube qu'elle dessine irrégulière. Cette dernière contient des cellules desquamées et altérées. Quelques cellules de la bordure ont leur protoplasme remplacé par une grosse vacuole. Ici non plus, on ne rencontre ni karyokinèses ni monstruosités nucléaires.

Il s'agit là, sans doute, d'hyperplasie adénomateuse, mais étant donnée la fréquence de transformations épithéliales suivant ces deux aspects dans les cancers, on peut se demander s'il ne faut pas y voir un état précancéreux, un stade de début de l'évolution vers la tumeur maligne.

Autour de nombreux tubes glandulaires, on peut constater l'existence d'une infiltration mononucléaire discrète, avec quelques macrophages.

Les vaisseaux sont en général peu touchés. Cependant une artère assez grosse présente une dégénérescence calcaire intense de sa tunique moyenne.

Glandes surrénales. — La capsule fibreuse qui enveloppe l'organe présente une épaisseur plus grande que normalement; de sa face interne partent des trousseaux conjonctifs grêles, encerclant les cellules de la zone glomérulaire. Les travées de premier ordre sont également un peu plus épaisses qu'à l'état normal, en sorte qu'il existe un certain degré de sclérose de la capsule et de la couche glomérulaire.

Dans l'épaisseur de la capsule fibreuse, on note la présence assez fréquente de glandes surrénales accessoires qui sont, elles aussi, le siège de lésions scléreuses.

On y rencontre relativement assez nombreux, surtout au voisinage de la couche glomérulaire et autour des vaisseaux, des macrophages et des mononucléaires moyens.

Le parenchyme glandulaire est manifestement hyperplasique. La disposition normale des travées cellulaires est bouleversée; ces travées cessent d'être parallèles entre elles; elles sont

coupées par le rasoir sous toutes les incidences et apparaissent ainsi dessinant des acini. L'épaisseur de ces travées est variable, souvent plus considérable qu'à l'état normal. Cette hyperplasie a, par places, une tendance aux formations nodulaires sans aboutir jamais à l'adénome vrai ; elle est variable d'intensité d'une surrénale à l'autre et d'un point à un autre dans une même surrénale ; mais elle n'est absente complètement en aucun point.

La couche glomérulaire participe pour son compte à l'hyperplasie par l'augmentation de son épaisseur et son bouleversement. Mais, en plus, on constate que les îlots de cellules sont plus espacés que dans le restant de la coupe à cause de la prolifération du tissu conjonctif ; un certain nombre d'entre eux paraissent atrophiés.

Les cellules sont également modifiées : à un très faible grossissement, la coupe présente un aspect particulièrement clair. Cela tient à ce que les spongiocytes sont augmentés de nombre d'une manière manifeste et que leurs vacuoles sont plus nombreuses et plus volumineuses que normalement. Cet état d'hyperépinéphrie ne s'accompagne d'aucune dégénérescence cellulaire manifeste. De plus, étant donnée l'hyperplasie de la glande, la disposition des zones claires est beaucoup moins régulière qu'à l'état normal.

Le pigment nous a paru très nettement augmenté de quantité. Les cellules qui en contiennent sont plus nombreuses et plus chargées qu'à l'état normal.

L'étude de la zone médullaire ne nous a pas permis d'y découvrir de lésions bien nettes.

Les vaisseaux présentent d'une façon générale leur paroi épaissie, sclérosée, souvent infiltrée de cellules de la série lymphoïde, moyens mononucléaires et macrophages. On trouve d'autre part assez fréquemment, par places, de petits îlots de cellules de diapédèse formés de cellules lymphoïdes, en majorité du type macrophage (Pl. XV, fig. 9).

Corps thyroïde. — Le corps thyroïde présente un certain nombre de formations nettement tumorales de différentes tailles. Les unes sont de petits cysto-adénomes bien encapsulés, ne présentant rien de particulier.

Celle qui, plus grosse que les autres, formait une tumeur bien

caractéristique à l'œil nu, est un fibro-adénome. A la périphérie, se trouvent des vésicules thyroïdiennes petites et en général régulières, beaucoup dépourvues de tout colloïde. Au centre de la tumeur, sur sa plus grande étendue, les vésicules sont ou très espacées ou complètement absentes. La tumeur est formée uniquement par un tissu fibreux dense, entremêlé de traînées de cellules diapédétiques mononucléées. Très fréquemment, ce tissu fibreux est dégénéré, devenu hyalin et ne prend qu'imparfaitement ou nullement les colorants du collagène. Par places, on trouve de vastes îlots de colloïde, non contenue par un épithélium, celui-ci ayant sans doute existé primitivement et dégénéré par la suite. Cette tumeur est nettement encapsulée, dans une coque de tissu fibreux bien délimitée et fortement infiltrée de mononucléaires (Pl. XIV, fig. 3).

Nous nous attarderons davantage à l'étude du corps thyroïde en dehors des régions tumorales. Les régions immédiatement voisines ont leurs vésicules aplaties concentriquement et atrophiées. Les parties du corps thyroïde que l'on peut considérer comme non influencées par les tumeurs présentent elles-mêmes des modifications marquées. Le tissu conjonctif y est plus abondant que d'ordinaire, formant des bandes scléreuses assez abondamment pourvues de cellules conjonctives et infiltrées de mononucléaires. Il découpe la glande en lobules assez petits. Souvent aussi, le tissu conjonctif interacineux est proliféré.

Les vésicules elles-mêmes sont inégales de taille, mais en général très petites et pauvres en colloïde. Même dans celles qui, plus volumineuses, ont une lumière centrale d'une certaine étendue, la colloïde est peu abondante et ne remplit qu'en partie la cavité. Il existe un grand nombre de boyaux épithéliaux pleins, certainement beaucoup plus fréquents qu'à l'état normal. Les cellules thyroïdiennes elles-mêmes ne nous ont pas paru présenter de lésions.

Hypophyse. — Dans le lobe glandulaire de l'hypophyse, il semble que, du moins en certains points, le squelette conjonctif soit plus abondant que normalement, ses mailles sont épaisses et délimitent des alvéoles plus petites que sur une glande jeune.

Il semble que la colloïde se retrouve à la fois plus fréquemment et en plus grande quantité qu'à l'habitude : en dehors de

grosses vésicules situées au voisinage du lobe nerveux, on rencontre souvent, disséminés sur toute la coupe, des acini contenant une boule de colloïde plus ou moins considérable. On n'en trouve pas dans les vaisseaux.

Au point de vue cytologique, on est frappé du nombre considérable des cellules acidophiles. Sur la plus grande étendue de la coupe, elles forment la grande majorité des éléments. Elles sont assez variables comme dimensions, certaines pouvant être très grosses ; parfois, elles sont vacuolaires. Leur noyau est généralement bien coloré; quelquefois, surtout chez les plus petites, il est pycnotique. On rencontre aussi, en même temps que des cellules chromophobes plus petites, de grandes cellules à protoplasme basophile granuleux qui, elles, sont très souvent vacuolaires. En d'autres points de la coupe, mais plus rarement, ce sont les éléments chromophobes qui sont en majorité.

Plexus choroïdes. — Les plexus choroïdes présentent en grand nombre des chalcosphérites ; celles-ci, visibles à l'œil nu sur les coupes, grâce à l'intensité avec laquelle elles prennent l'hématéine, sont formées de couches concentriques; elles sont appendues au côté des villosités, recouvertes, retenues seulement par une mince couche de tissu conjonctif, l'endothélium cubique de revêtement manquant très généralement à leur niveau. Plus rarement, on en peut trouver dans l'épaisseur des plexus (Pl. XV, fig. 16).

Ces formations s'établissent sans doute dans la lumière des capillaires; parfois, en effet, on peut reconnaître des cellules endothéliales à leur contact ; le plus souvent cependant, celles-ci ont disparu ou sont masquées, si bien que la calcosphérite semble incluse dans le tissu conjonctif.

Dans les portions les moins atteintes, on trouve des amas calcaires plus petits qui, eux, semblent bien s'être développés en plein tissu conjonctif; ils sont plus irréguliers de forme et de contours, ils sont comme épineux.

V. — Organes génitaux.

Utérus. — L'*utérus*, au niveau du col, présente un épithélium de revêtement partout continu et d'aspect de prime

abord normal. Cependant, les cellules des couches superficielles du corps muqueux sont tuméfiées, extrêmement claires, comme vésiculeuses, avec des gouttelettes acidophiles. Leur membrane est épaisse, très acidophile, et les ponts intercellulaires n'y apparaissent qu'avec peu de netteté.

Immédiatement au-dessus de l'épithélium s'étend une zone d'infiltration leucocytique. Cette zone est à peu près continue ; tantôt très discrète, tantôt très marquée, au voisinage de la portion *isthmique* de la muqueuse, elle peut donner lieu par places à de véritables nodules de tissu adénoïde. Les éléments qui la composent sont en majorité des mononucléaires ; on y trouve quelques polynucléaires ; par places, des plasmazellen assez nombreuses ; les macrophages n'y sont point rares, non plus que les lymphocytes. Mais l'élément dominant est le moyen mononucléaire ; assez souvent, son protoplasme est abondant et acidophile. Cette zone d'infiltration s'arrête assez brusquement et ne pénètre pour ainsi dire pas dans la profondeur. Cependant, dans toute l'épaisseur de la paroi du col, on trouve dans le tissu conjonctif des leucocytes en quantité plus considérable, semble-t-il, qu'à l'état normal.

La paroi du col est constituée surtout par du tissu conjonctif fibreux dans la plus grande étendue, assez fréquemment adipeux à la partie externe de sa partie inférieure. Mais jusqu'au bord du col, on trouve des faisceaux de fibres musculaires lisses, parfaitement différenciées et bien reconnaissables.

Les vaisseaux présentent souvent, surtout au niveau des artères d'un certain calibre, de l'endovascularite fibreuse ancienne.

Le passage de l'épithélium pavimenteux à l'épithélium cylindrique se fait par une transition assez longue : sur une étendue assez considérable, l'épithélium est composé d'un petit nombre d'assises de cellules plates, avant de devenir nettement cylindriques. Au-dessous de cet épithélium de transition, on trouve des glandes kystiques à épithélium cylindrique, mais parfois on peut rencontrer de petits îlots d'épithélium pavimenteux à deux ou trois assises sur la paroi de ces glandes. Il est possible qu'il y ait là une métaplasie pavimenteuse de l'épithélium cylindrique.

Au niveau de la muqueuse du corps, on trouve des modifications assez importantes : les glandes tubulées sont diminuées de nombre et celles qui restent sont hyperplasiées ; plus longues

et plus sinueuses que normalement, elles ont une tendance à se grouper en îlots d'aspect adénomateux ; beaucoup sont devenues kystiques et forment sous la muqueuse des œufs de Naboth plus gros qu'un grain de mil (Pl. XVI, fig. 17).

La zone d'infiltration sous-épithéliale, qui existait si nette au niveau du col, n'existe pas dans le corps et cesse dès que l'épithélium a pris nettement le type cylindrique. Le chorion muqueux est très riche en cellules, mais ces cellules sont de type conjonctif et l'on ne peut dire que leur abondance soit plus considérable qu'à l'état normal.

Les faisceaux musculaires qui forment la paroi utérine sont nettement plus grêles que chez un sujet jeune ; de plus, ils sont séparés par de plus grandes étendues d'un tissu fibreux plus dense. En outre, il semble que, par places au moins, les cellules musculaires soient plus inégales et quelques-unes atrophiées.

Les artères, surtout celles qui ont un certain calibre, présentent des lésions très marquées. Presque sur toutes, on trouve une endartérite fibreuse ancienne qui peut être très accusée, à tendance oblitérante. Souvent, surtout pour les grosses artères de la corne utérine, il s'y surajoute de l'athérome. La calcification se présente sous forme d'un anneau complet ou incomplet, mais toujours assez épais, qui se trouve dans l'épaisseur du tissu fibreux d'apposition endartériel. La musculeuse, peut-être réduite, persiste constamment et n'est pas interrompue (Pl. XVI, fig. 16).

Sur quelques vaisseaux, les fibres du tissu conjonctif constituant l'endartérite s'écartent, notamment au voisinage des zones calcifiées, délimitant une petite cavité dans laquelle on trouve des macrophages.

Ovaires. — Les ovaires sont réduits à l'état de petits corps uniquement fibreux. Ils sont composés d'une coque assez mince de tissu fibro-conjonctif fasciculé, très riche en cellules conjonctives dessinant des tourbillons ; elle ne contient aucune formation différenciée. Cette coque est interrompue au niveau du hile. A l'intérieur on remarque d'assez nombreuses formations rubannées et pelotonnées constituées par du tissu collagène fibrillaire à peu près dépourvu de noyaux. Leur forme permet de les identifier à des cicatrices de corps jaunes.

Au centre on trouve de très nombreux vaisseaux, encore que quelques-uns soient complètement oblitérés. La plupart des artères présentent de l'endartérite chronique à tendance oblitérante. Les grosses artères du ligament large présentent parfois des placards calcaires dans leur tunique moyenne (Pl. XVI, fig. 18).

VI. — Système nerveux central.

Nous serons brefs sur ce chapitre, la question ayant été étudiée à plusieurs reprises par des neurologistes ou des psychiatres et sur de nombreux cas. Nous nous bornerons donc ici, et seulement pour être complets, à énumérer rapidement les lésions que nous avons trouvées à l'examen du système nerveux central de notre vieille femme.

Cerveau. — Dans toute l'étendue du parenchyme, mais prédominant dans la substance blanche, existe une infiltration lymphocytaire diffuse discrète, qui s'exagère autour des vaisseaux, pour former des manchons inflammatoires périvasculaires plus ou moins complets, le plus souvent peu épais. Les cellules qui composent cette infiltration sont des mononucléaires moyens et des lymphocytes. Par contre, la névroglie paraît sensiblement normale, les vaisseaux ne présentent pas de lésions autres que celles de l'adventice. L'épendyme est très sensiblement normal.

Les cellules sont souvent très altérées. D'abord il existe presque toujours une surcharge pigmentaire qui peut être tout à fait considérable. Les cellules sont atrophiées, plusieurs ont leurs prolongements disparus et prennent une forme globuleuse. Très souvent les noyaux sont en position excentrique et ce déplacement ne dépend pas toujours de la surcharge pigmentaire, le pigment pouvant être en petite quantité et aggloméré à l'autre extrémité de la cellule. Souvent la cellule est réduite à un petit bloc protoplasmique à peu près méconnaissable. Les figures de neuronophagie sont fréquentes.

Cervelet. — Les cellules de Purkinje sont fréquemment altérées ; elles sont atrophiées, irrégulières, parfois fortement acidophiles. Les prolongements peuvent avoir disparu. Le noyau présente des lésions dégénératives. Par contre, les figures de

neuronophagie sont peu nombreuses. Ces cellules ne contiennent jamais de pigment.

Les cellules de la couche des grains semblent être proliférées dans la partie périphérique de la couche.

Moelle. — La moelle apparaît comme ayant des lésions cellulaires et nucléaires plus marquées que le cerveau ; au contraire les lésions d'infiltration sont moins intenses.

Les lésions dégénératives des cellules nucléaires sont d'autant plus nombreuses et accusées que l'on considère une région plus haute de la moelle. Elles sont plus intenses dans les cornes postérieures que dans les cornes antérieures ; elles consistent en atrophie des cellules et surchage pigmentaire, celle-ci étant moins marquée que dans le cerveau. La réaction neuronophagique est légère.

Les cordons sont sensiblement normaux, à part la présence d'un grand nombre de corps sphériques calcaires, très abondants dans les cordons postérieurs.

L'épendyme est un peu proliféré et présente une légère infiltration dans son voisinage.

Les méninges, normales dans les parties hautes de la moelle, présentent un léger épaississement au niveau de la pie-mère lombaire.

Les vaisseaux, généralement normaux, peuvent présenter un léger degré de sclérose.

VII. — Système de locomotion.

Os. — La *moelle osseuse diaphysaire* prélevée dans le tiers supérieur du canal fémoral est réduite à ses vaisseaux et à du tissu adipeux ; sur toute l'étendue de la coupe on ne voit qu'un réseau dessiné par des cellules graisseuses avec de loin en loin aux points nodaux des noyaux cellulaires. Ces noyaux sont le plus souvent des noyaux fusiformes des cellules adipeuses. Parfois viennent s'y joindre des cellules arrondies à protoplasma basophile relativement abondant. Sur une artère nous avons constaté une calcification assez marquée de la tunique moyenne accompagnée d'une légère infiltration de leucocytes mononucléaires. Les autres vaisseaux présentent tous leurs parois

scléreuses et souvent on rencontre dans leur épaisseur des mononucléaires assez rares, il faut le dire (Pl. XV, fig. 8).

Le *crâne* présente certainement au niveau du diploé des mailles beaucoup plus larges que normalement. Les tables externe et interne par contre (surtout l'externe) sont minces et composées de tissu presque absolument compact. Le tissu osseux dans son ensemble présente des ostéoplastes espacés, la substance fondamentale paraissant plus dense qu'à l'état normal.

Les canaux de Havers, relativement rares au niveau de la surface des tables interne et externe, sont souvent dilatés et remplis par une moelle fibreuse au voisinage du diploé; assez fréquemment tout autour d'eux on voit une couronne d'ostéoblastes directement opposés sur le tissu osseux déjà formé. A mesure qu'on approche du diploé, les canaux de Havers s'élargissent et l'on trouve tous les passages entre les canaux et les lacunes du diploé. A mesure, la moelle devient moins fibreuse et plus riche en cellules.

La moelle du diploé présente de la graisse en assez grande abondance ; néanmoins elle est encore riche en cellules. Les cellules sont des hématies, des myélocytes et de rares hématies nucléées. Les mégacaryocytes semblent diminués de nombre ; les myéloplaxes sont en nombre sensiblement normal, mais sont relativement petites, ne renfermant que trois à neuf noyaux en moyenne, et nous n'en avons vu que rarement en fonction ostéoclasique.

Côtes. — Au niveau des articulations chondro-costales, on peut constater plusieurs lésions intéressantes. Trois organes sont à considérer; le tissu fibreux d'enveloppe (périoste et périchondre), le cartilage et l'os.

Le périoste et le périchondre sont formés de tissu fibreux dense et extrêmement pauvre en cellule. Au niveau de l'os la moelle sous-périostée n'existe pas.

Le cartilage est très fortement calcifié dans sa partie centrale; par places de petites cavités se creusent, au sein de cette masse dégénérée. Dans les couches périphériques la substance fondamentale n'est pas hyaline, il y a des différences de teinte dans les préparations à l'hématoxyline-éosine et au Van Gieson, il semble qu'il y ait une ébauche de fibrillation. Les cellules

chondrales présentent également des lésions évidentes. Sur les bords du cartilage les cellules et les capsules sont disposées dans toutes les directions, elles sont désorientées ; les capsules ne contiennent en général qu'une seule cellule, sauf tout à fait sous le périchondre où l'on trouve d'assez vastes capsules irrégulières contenant trois ou quatre chondroblastes plus ou moins déformés. Un certain nombre de cellules disséminées parmi les autres sont petites et semblent nécrosées.

Au fur et à mesure que l'on arrive dans l'épaisseur du cartilage, la proportion de ces cellules augmente et elles deviennent la majorité.

L'union du cartilage et de l'os n'est pas non plus normale, le cartilage déborde l'os en largeur, il forme une petite nouure — et dans le sens de la longueur, une bande de cartilage chemine entre l'os et le périoste sur une certaine longueur. D'autre part, par places, les lamelles osseuses pénètrent dans le cartilage, ce qui donne une zone d'union irrégulière. Le cartilage est vascularisé sur une certaine étendue à partir de cette zone. Le passage du cartilage à l'os se fait brusquement sans aucune préparation du côté du cartilage ; les deux tissus sont simplement juxtaposés suivant une ligne sinueuse (Pl. XIV, fig. 5 et 6).

L'os est formé par une coque périphérique très mince de tissu compact et par du tissu spongieux.

Le tissu compact ne présente rien de bien particulier ; peut-être les ostéoblastes sont-ils moins nombreux que normalement.

Le tissu spongieux présente des mailles extrêmement larges ; celles-ci sont remplies par une moelle très abondante et qui semble assez active. Cette moelle est perforée par un nombre limité de cavités graisseuses relativement petites et n'occupant qu'une partie bien minime de la surface. Le reste est formé par des sinus sanguins dilatés, gorgés de sang et de cellules tassées les unes contre les autres. Ces cellules sont constituées, autant qu'on peut en juger sur des coupes obtenues après décalcification, par des myélocytes ; les hématies nucléées sont rares, les mégacaryocytes paraissent diminués de nombre ainsi que les myéloplaxes qu'on trouve exceptionnellement en fonction ostéoclasique.

Muscles. — Les muscles présentent des lésions qui, du reste, semblent assez récentes ; il y a d'abord une inégalité de diamètre

des fibres déjà visible sur les coupes longitudinales, manifeste sur les couches transversales. La plupart sont plus petites que normalement, soit par atrophie simple, ce qui semble peu vraisemblable, étant donné que les noyaux ne sont pas augmentés de fréquence, soit plus vraisemblablement par division longitudinale, quoique les figures démonstratives de ce phénomène soient bien rares. Par contre un nombre notable de fibres ont un diamètre nettement supérieur à la moyenne (1). La section de nombreuses fibres est nettement plus arrondie que normalement.

D'autre part, des lésions des myofibrilles se rencontrent assez fréquemment ; souvent la fibre est ondulée et en état de dégénérescence cireuse. Moins souvent on note de la dégénérescence granuleuse.

Le tissu interstitiel nous a paru normal.

Les artères sont assez souvent atteintes d'endartérite plastique. Les nerfs nous ont paru sains.

Peut-être ne faut-il voir là qu'un état surajouté et dû au confinement au lit. En effet, il n'y a que des lésions banales, assez légères, comme on est habitué à en rencontrer dans toutes les atrophies musculaires bénignes. Mais ces lésions qui sont très nettes au niveau du droit antérieur du quadriceps sont beaucoup moins marquées au niveau du temporal, muscle dont les fonctions ont été forcément mieux préservées jusqu'à un moment très voisin de celui de la mort.

VIII. — Téguments.

Le *cuir chevelu* ne nous a pas paru présenter d'autre lésion qu'une infiltration discrète, par places, surtout nette autour des vaisseaux et des glandes sudoripares. Cette infiltration est formée de mononucléaires et de macrophages, avec prolifération des cellules fixes.

La *peau*, prélevée au niveau du *front* et du *thorax*, présente des lésions de plusieurs ordres. L'épiderme est atrophique, ne présente que cinq ou six couches de cellules ; les karyokinèses y sont rares, bien que l'on rencontre sans difficultés des cellules

(1) Les diamètres extrêmes que nous avons trouvés sont 4 et 35 μ.

basales bi-nucléées. Il existe des polynucléaires en migration entre les cellules.

Mais ce qui frappe le plus à l'examen des couches superficielles de la peau, c'est la disparition presque complète des papilles; la ligne d'union dermo-épidermique est presque droite, sur de longues étendues, brisée seulement de loin en loin par une papille qui peut être même atrophiée.

Les couches toutes superficielles du derme sont normales, sauf que l'on rencontre des nids de cellules à pigments, très nombreuses par places, qui s'insinuent entre les cellules épidermiques. Mais au-dessous, sur les deux régions examinées, de larges îlots du derme, sur plus des 3/4 de son épaisseur, présentent un état particulier.

Les fibres de collagène ont perdu toute structure et toute élection pour les colorants ; elles apparaissent sous forme de masses irrégulières de substance grenue colorée d'une teinte sale ; il n'y a plus de noyaux, si ce n'est ceux de quelques rares cellules de diapédèse ; ces masses peuvent être entrecoupées de fibres et de cellules conjonctives normales. Au-dessous, les dernières couches du derme et l'hypoderme reparaissent avec des caractères normaux.

Il existe un léger degré d'infiltration diffuse et de réaction des cellules fixes, surtout appréciable autour des glandes sudoripares; on y trouve quelques mononucléaires et quelques macrophages.

CONCLUSIONS

De l'étude anatomique dont nous venons de donner les résultats, nous nous croyons autorisés à tirer les conclusions suivantes :

Après avoir éliminé, autant qu'il est possible, les lésions liées à l'épisode aigu ayant amené sa mort, les modifications anciennes chez notre vieille femme nous ont paru multiples et complexes : sclérose, infiltration mononucléaire et macrophagique, hypoplasie, dégénérescences cellulaires, calcification nous ont semblé être les grands processus de sénescence de ses organes.

De toutes ces lésions, la plus frappante et la plus générale

est la sclérose, conséquence elle-même de l'infiltration mononucléaire et macrophagique. Tous les organes en présentent à des degrés divers.

L'hypoplasie est manifeste dans les organes adénoïdes. Le volume constaté macroscopiquement, le poids des organes, l'état histologique, tout concorde pour prouver un ralentissement des fonctions de ces organes. Cette hypoplasie, bien que marquée, n'est que relative et n'aboutit pas à l'aplasie, puisque l'on peut encore y voir des karyokinèses.

Les lésions cellulaires sont parmi les moins marquées et les moins fréquentes. Rappelons celles que nous avons trouvées dans le foie et le pancréas ; d'autre part les ganglions présentaient quelques lésions nécrotiques unicellulaires. L'hypophyse, la thyroïde présentent des signes d'hypofonctionnement alors qu'au contraire la surrénale est en hyperépinéphrie.

La calcification est très fréquente, elle frappe les vaisseaux, les plexus choroïdes, la moelle.

La question capitale dans l'étude de la vieillesse est celle de la pathogénie des lésions, et bien souvent l'histologie serait incapable de la résoudre sans le secours de l'expérimentation. L'une et l'autre doivent cependant fournir leur appoint à la solution.

L'hypothèse de Metchnikoff, sur le rôle des poisons intestinaux de la série aromatique, nous paraît expliquer un bon nombre de faits, notamment celui des lésions artérielles si étendues et si considérables, la plupart des scléroses et des infiltrations, un certain nombre de dégénérescences cellulaires.

L'on saisit bien le mécanisme de cette intoxication chronique par voie sanguine, par exemple au niveau du cœur : ce sont en effet les portions les plus directement en contact avec le sang qui sont atteintes par la sclérose, portions sous-endocardiques et portions périartérielles. D'autre part, par l'expérimentation, Dratchinsky a reproduit des lésions analogues à celles que nous avons trouvées dans le cerveau et sur les vaisseaux.

Toutefois, nous nous permettrons de dire que cette hypothèse ne nous semble pas expliquer tous les faits observés et que d'autres causes doivent intervenir.

L'auto-intoxication ne peut pas être envisagée, croyons-nous,

pour l'involution de certains organes, comme les organes génitaux de la femme, involution qui arrive, peut-on dire, à date fixe, quel que soit l'état antérieur du sujet et son mode de vie. Puis, si l'on veut bien se reporter à notre description, l'on pourra constater que les lésions artérielles sont prédominantes dans les organes atteints de cette hypoplasie depuis longtemps constatée dans la vieillesse : organes génitaux, mamelle, rate, moelle osseuse. D'autre part, les lésions des cellules glandulaires ne peuvent pas toutes, à notre avis, s'expliquer par cette unique cause. On comprend bien l'hyperépinéphrie tenant à la lutte contre l'intoxication, mais non l'hypofonctionnement de l'hypophyse et de la thyroïde. La nécrose rencontrée au niveau de certaines cellules lymphatiques, des ganglions ne ressemble pas aux dégénérescences cellulaires du foie et du pancréas.

Pour toutes ces raisons, nous serions assez portés à admettre que tout cet ensemble lésionnel complexe ne peut être dû qu'à un ensemble étiologique complexe, une série infinie de causes dont le temps ne serait que le totalisateur et que l'on pourrait essayer de classer en groupes :

1° L'auto-intoxication par les poisons digestifs bien mise en lumière par M. Metchnikoff et ses élèves garde une place très importante, sinon la première; elle produirait la plupart des lésions d'infiltration macrophagique et de sclérose et un bon nombre de lésions cellulaires (cerveau). Il est à noter que toutes les cellules de l'organisme ne sont pas aussi sensibles à ces poisons, les phagocytes et le tissu conjonctif étant les plus résistants, le collagène restant à peu près immuable une fois élaboré ;

2° La sclérose peut être produite aussi par d'autres causes : l'auto-infection canaliculaire ascendante nous a semblé jouer un rôle indéniable, concurremment du reste avec l'auto-intoxication sanguine, dans la genèse des lésions pancréatiques, salivaires et peut-être aussi hépatiques ;

3° La série infinie au cours d'une longue existence des maladies infectieuses ou des intoxications exogènes grandes ou petites, parfois inaperçues, qui chaque fois détruisent une parcelle de parenchyme, même minime, lequel ne se régénère qu'en partie et est remplacé par une cicatrice scléreuse, et de

ceci nous pourrions prendre un exemple dans le rein, dont les lésions tellement parcellaires ne se peuvent guère expliquer autrement;

4° L'usure des cellules et leur vieillissement, leur impotence plus ou moins complète à fonctionner nous semble être bien visible dans les transformations acidophiles du foie, du pancréas, de l'hypophyse. L'aboutissant de cette usure nous semble tout à fait manifeste dans le poumon, où l'on ne constate que des lésions d'usure presque mécanique, pourrait-on dire, et où il n'existe ni sclérose, ni trace de réaction inflammatoire;

5° Une cause qui nous reste tout à fait mystérieuse serait le ralentissement progressif de la reproduction cellulaire. Il ne nous semble pas douteux que le pouvoir de reproduction des cellules soit surtout un apanage de la jeunesse et que, à moins de cause provocatrice spéciale, comme cela se passe dans les néoformations cancéreuses du reste rares dans la vieillesse avancée, les cellules ne se reproduisent qu'avec une facilité moindre à mesure que l'individu avance en âge (1). Ceci aboutirait à l'hypoplasie de certains organes, et il est à remarquer que ces organes le plus hypoplasiés sont précisément ceux qui doivent fournir la plus grande quantité de cellules à l'organisme, cellules qui, constamment usées, ont besoin d'être constamment renouvelées, et ces organes sont les organes lymphoïdes et la moelle osseuse.

Enfin, pour terminer, nous ferons observer qu'il peut paraître surprenant que, chez une femme aussi vieille, les lésions séniles soient, somme toute, légères.

La raison en est simple; chez les individus chez qui les causes de sénilité que nous avons énumérées : auto-intoxication, digestive, auto-infections, hétéro-infections, hétéro-intoxications, auront été multiples, les lésions de sénilité seront précoces et intenses et l'individu ne parviendra pas à un âge avancé.

Au contraire il est permis de supposer que ces causes ont été minimes chez notre sujet, et ceci nous est un exemple de la différence existant entre la *vieillesse* et la *sénilité*.

(1) Certains organes, cependant, peuvent se régénérer indéfiniment; tels sont les ongles et les cheveux. Chez notre sujet, les cheveux, coupés à l'arrivée à l'hôpital Pasteur, poussaient de plus d'un centimètre par mois.

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche XIV. — **Fig. 1.** — *Aorte* dans une partie non athéromateuse. Infiltration leucocytaire endo et périaortique. G. = 25/1. Van Gieson.

Fig. 2. — *Foie.* Un espace porte montrant une infiltration mononucléaire assez abondante. Travées hépatiques normales. G. = 150/1. Van Gieson.

Fig. 3. — *Corps thyroïde.* Adéno-fibrome. Infiltration mononucléaire au niveau de la capsule d'enveloppe. G. = 80/1. Van Gieson.

Fig. 4. — *Ganglion lymphatique. a, b, c, d,* quatre figures de karyokinèse trouvées dans différents points d'une même coupe. Fort grossissement. Van Gieson.

Fig. 5. — *Côte.* Union de l'os et du cartilage. Lésions du cartilage. Nouure costale. G. = 25/1. Van Gieson.

Fig. 6. — *Côte.* Lésions du cartilage. G. = 60/1. Van Gieson.

Planche XV. — **Fig. 7.** — *Rein.* Un foyer de sclérose et d'infiltration mononucléaire au-dessous de la capsule elle-même fortement épaissie à ce niveau. Sclérose glomérulaire marquée. G. = 80/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 8. — *Moelle osseuse diaphysaire.* Transformation graisseuse totale. Athérome. G. = 80/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 9. — *Glande surrénale.* Foyer d'infiltration à mononucléaires et à macrophages. G. = 200/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 10. — *Rate.* Sclérose et hypoplasie de la pulpe. Atrophie des corpuscules de Malpighi. Lésions artérielles. G. = 30/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 11. — *Rate.* Une karyokinèse, et, peut-être, une division directe. Fort grossissement. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 12. — *Peau du thorax.* Atrophie de l'épiderme. Disparition des papilles. Augmentation des pigmentophores. Nécrose de la partie superficielle du derme. Infiltration discrète à mononucléaires. G. = 65/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 13. — *Plexus choroïdes.* Congestion et calcosphérites. G. = 80/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 14. — *Cuir chevelu.* Infiltration à mononucléaires du derme. G. = 90/1. Hématéine-éosine-orange.

Planche XVI. — **Fig. 15.** — *Appendice.* G. = 20/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 16. — *Corne utérine.* Atrophie de la muqueuse. Athérome intense. G. = 60/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 17. — *Utérus; portion inférieure du corps.* Métaplasie pavimenteuse de l'épithélium cylindrique. Diminution de nombre des glandes. Evolution adénomateuse et kystique de celles qui persistent. G. = 25/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 18. — *Ovaire.* Sclérose et atrophie. Cicatrices de corps jaunes. Lésions artérielles. G. = 20/1. Hématéine-éosine-orange.

Fig. 19. — *Mamelle.* Sclérose. Dilatation kystique de certains culs-de sac glandulaires. Infiltration leucocytaire autour des culs-de-sac. G. = 80/1. Hématéine-éosine-orange.

RECHERCHES SUR LES MICROBES AMYLOLYTIQUES DE L'INTESTIN

par le Dr Eugène WOLLMAN.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

A la suite des recherches de Metchnikoff et de ses élèves sur la putréfaction intestinale, les microbes producteurs d'acide ont acquis une importance particulière, et de nombreux travaux (1) ont déjà apporté sur leur compte des données intéressantes.

Comme la présence de sucres constitue pour l'activité de ces microbes une condition essentielle, et comme, d'autre part, d'après toute une série de données concordantes (2), le sucre ingéré n'arrive pas ou n'arrive qu'en quantité infime dans le gros intestin, il était intéressant de rechercher si la flore intestinale ne renfermait pas de microbes capables de transformer en sucre les hydrates de carbone insolubles : celluloses et amidons.

C'est sur les microbes capables de saccharifier l'amidon, les microbes *amylolytiques*, que j'ai porté mon attention.

La propriété d'attaquer l'amidon, commune parmi les moisissures, où elle se rencontre assez constamment, est beaucoup moins répandue chez les bactéries. Toutefois, certains saprophytes (Bac. prodigiosus, Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac. megatherium), et quelques bactéries pathogènes (bactéridie charbonneuse, vibrion cholérique, vibrion de Finkler-Prior), produisent de l'amylase.

(1) Cohendy, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906.
Tissier, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1906.
Belonowsky, *Biochem. Zeitschrift*, 1907 ; *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1907.
G. Bertrand et Weisweiller, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1906.
G. Bertrand et Duchacek, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1909, etc.
(2) Macfadyen, Nencki et Sieber, *Arch. f. experim Pathologie und Pharmakologie*, 1891.
Ewald, *Virchow's Archiv*, 1879.
Berthelot, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1910.

Parmi les microbes de l'intestin étudiés jusqu'ici, on n'a rencontré qu'exceptionnellement, et sans s'y arrêter, des formes possédant un pouvoir amylolytique net. Dans la nouvelle édition de leur livre (1), Schmidt et Strasburger disent : « Les bactéries qu'on rencontre normalement dans les matières fécales semblent dépourvues de pouvoir amylolytique et ne digèrent que le sucre (2). » Mais ils ajoutent, qu'occasionnellement on peut en rencontrer : ainsi Kersbergen aurait isolé un microbe capable d'attaquer l'amidon.

En réalité, l'affirmation de Schmidt et Strasburger n'est pas tout à fait exacte. Lorsqu'on ensemence des matières fécales sur de l'amidon (la quantité minime de matière ensemencée permet d'exclure l'action des traces de diastases digestives qui peuvent encore se rencontrer dans les fèces), on voit souvent une dissolution plus ou moins marquée de l'amidon avec production de faibles quantités de sucre. Le même phénomène peut s'observer encore avec des matières fécales chauffées à 100 degrés, où naturellement, il ne peut plus être question de ferment digestif. Lorsqu'on cherche à isoler les différents microbes qui ont poussé dans l'amidon, la plupart du temps on n'en trouve pas qui soient doués d'un pouvoir amylolytique tant soit peu net. Il est extrêmement probable qu'il s'agit ici d'un exemple d'association microbienne ; il arrive en effet qu'on obtienne une faible action sur l'amidon avec un mélange de plusieurs microbes, dont chacun en particulier ne manifestait aucun pouvoir amylolytique appréciable.

D'autre part, parmi les microbes qui certainement doivent être rangés dans les « bactéries normales des matières fécales », il en est un, le Bac. Welchii ou perfringens, qui est doué d'un pouvoir amylolytique considérable : ferment puissant, il brûle le sucre formé avec production d'acides et de gaz.

Quant aux autres microbes, capables d'attaquer l'amidon, qu'on rencontre plus ou moins fréquemment dans les selles (*Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*), ils ne présentent qu'un intérêt secondaire (au moins chez l'homme), parce que, d'une part, ils ne se trouvent probablement dans l'intestin que de passage et

(1) *Die Faezes des Menschen*, 3e édition, Berlin, 1910.

(2) « Zur amylolyse sind die normalerencise vorkommenden kotbakterien anscheinend wicht befähigt. Sie vergären nur den Zucker ».

à l'état sporulé, et que, d'autre part ils brûlent complètement les faibles quantités de sucre formé, sans produire d'acidité tant soit peu marquée (1).

A ces considérations près, la thèse de Schmidt et Strasburger semble être exacte : dans une série de tentatives, je n'ai pas réussi à isoler, chez l'homme normal, de microbe ayant un pouvoir amylolytique marqué (2).

Je me suis alors adressé aux animaux, au singe, au chien, ainsi qu'à des espèces qui semblaient devoir, *a priori*, héberger des microbes amylolytiques : au lapin et à la poule.

La technique de l'isolement a toujours été très simple et sensiblement la même. On préparait des tubes d'amidon stérile à 3 ou 3,5 p. 100 avec 5 p. 1000 de chlorure sodique. Dans les premiers essais, j'attendais que l'amidon fût fortement liquéfié et je réensemençais alors dans un second tube d'amidon; j'attendais la liquéfaction de celui-ci et ainsi de suite. Après plusieurs passages, je cherchais à isoler les différents microbes.

N'ayant eu que des échecs et m'étant aperçu que la liquéfaction, dans les tubes successifs, devenait de plus en plus faible, j'ai modifié la technique en faisant alors les passages d'amidon à amidon à très court intervalle (18 heures environ).

L'amidon est, en effet, loin d'être un milieu électif : pour peu qu'il y ait saccharification, il devient, même en absence de matières azotées ajoutées (il y en a probablement toujours un peu dans l'amidon du commerce), un bon milieu de culture pour de nombreux microbes capables d'utiliser le sucre formé; ceux-ci, dans les passages successifs, prennent de plus en plus le dessus et empêchent l'isolement des microbes producteurs de sucre; on évite en partie cet inconvénient en faisant des passages à court intervalle.

Parmi les nombreux microbes isolés et étudiés au point de vue de leur action sur l'amidon, je ne m'arrêterai que sur les microbes *amylolytiques* au sens vrai du mot, c'est-à-dire des microbes dont l'action sur les hydrates de carbone se ramène surtout à leur action sur l'amidon. Le sucre produit n'est que

(1) Comme cela avait été constaté par Péré : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1896, et comme j'ai pu le vérifier.

(2) M. Metchnikoff a isolé chez un enfant un microbe qui semble être identique au Glycobacter proteolyticus, que nous décrivons ici.

très peu attaqué en absence d'aliments azotés; il ne l'est encore qu'en partie lorsqu'on ajoute au milieu à l'amidon du bouillon peptoné.

Il semble, par conséquent, que ces microbes soient de véritables ferments producteurs de sucre, dont ils n'utilisent qu'une très petite partie pour leur propre compte.

Ce fait est assez curieux lorsqu'on songe à la facilité avec laquelle les microbes les plus divers attaquent les sucres et à la résistance relative qu'offre l'amidon.

On peut, en se basant sur cette propriété de former du sucre, donner à ces microbes le nom de *glycobacter*; j'en distinguerai deux types : le *glycobacter proteolyticus* et le *glycobacter peptolyticus*.

Glycobacter proteolyticus.

Comme représentant de ce groupe, je décrirai un bacille isolé du contenu intestinal (ileum) d'un singe (Macacus cynomolgus); un microbe très voisin, sinon identique, a été isolé par M. Metchnikoff chez un nourrisson.

C'est un bâtonnet à bouts arrondis, le plus souvent rectiligne, rarement un peu infléchi, long de 6 μ environ sur 1 μ de largeur, la longueur peut d'ailleurs dépasser (sur gélose inclinée) 10 μ ou tomber à 2-3 μ. Les bâtonnets sont presque toujours isolés, rarement disposés deux à deux (formes courtes). Il ne se forme pas de chaînes. (Fig. 1.)

En bouillon, la longueur des bâtonnets est un peu plus grande.

Ce bacille se colore bien par les couleurs d'aniline basiques; il prend très mal le Gram; il ne donne pas la réaction de la granulose.

Il donne des spores avec une grande facilité. Dans les cultures sur gélose, celles-ci apparaissent après vingt à vingt-quatre heures. Il se forme un renflement subterminal ou médian, le bâtonnet s'épaissit et prend la forme d'un fuseau. Les spores résistent bien à la température de l'ébullition; ce bacille est très mobile.

Caractères des cultures. — Sur gélose inclinée, dans les cultures jeunes, les colonies sont tout à fait transparentes, n'atteignant 1 millimètre de diamètre que lorsqu'elles sont bien isolées.

Elles ont une forme irrégulièrement arrondie, à bords nets; lorsqu'elles sont confluentes elles forment une nappe transparente, très mince.

En gélose sucrée profonde, les colonies apparaissent au bout de vingt heures; elles sont petites, irrégulières; il y a production de gaz.



Fig. 1. — *Glycobacter proteolyticus.*
Culture de vingt-quatre heures sur gélose inclinée.

Dans le bouillon ordinaire, il se produit un trouble grumeleux, avec formation d'un dépôt granuleux après vingt-quatre heures; dans le bouillon glucosé, les phénomènes sont les mêmes, mais il y a dégagement de gaz pendant les premières vingt-quatre heures.

Le lait est faiblement coagulé après quarante-huit heures; il exsude un liquide clair; la caséine est lentement digérée, la réaction restant acide.

Dans la gélatine, les colonies sont rondes, assez régulières;

en ensemençant en piqûre, la liquéfaction se fait à partir du deuxième jour en forme de coupe.

Le blanc d'œuf n'est pas attaqué de façon appréciable; pas d'odeur; pas de réaction d'indol.

Sur pomme de terre, la culture apparaît au bout de trente à quarante heures sous forme d'une couche granulée, non sans analogie avec une culture sur pomme de terre de bacille tuberculeux, mais en plus blanc et en plus humide. L'odeur rappelle celle de pommes.

L'amidon est rapidement liquéfié et disparaît complètement lorsqu'on ajoute un aliment azoté.

Propriétés chimiques.

Ce bacille attaque les albumines, mais ne semble pas pousser loin leur digestion. La gélatine, liquéfiée rapidement, donne encore au bout d'un an la réaction du biuret, de façon très intense; ce temps écoulé, la recherche de la proline reste négative, même à des époques moins éloignées. La caséine digérée donne, après quinze jours, la réaction très intense du biuret; les réactions de la tyrosine (tyrosinase), de l'histidine (acide sulfanilique), du tryptophane (eau de brome) sont négatives. (Le lait digéré par le mesentericus, par exemple, donne à ce moment une réaction nette pour l'histidine et une réaction intense pour le tryptophane.) Dans le bouillon « blanc d'œuf » les réactions de la tyrosine et de l'histidine sont négatives au bout de quinze jours; on décèle un peu de tryptophane à l'eau de brome.

Action sur les hydrates de carbone.

L'amidon est attaqué d'une façon très énergique à l'aide d'une diastase qu'on peut assez facilement séparer. On fait une culture sur gélose-pomme de terre, on fait macérer ensuite les corps microbiens dans une solution de NaCl à 5 p. 1.000; en filtrant sur bougie Chamberland, on obtient un liquide qui saccharifie rapidement l'empois d'amidon. Cette amylase disparaît d'ailleurs assez rapidement (soixante-douze heures) du

filtrat; elle se conserve mieux dans la macération non filtrée de corps microbiens.

Je n'ai pas réussi à obtenir de l'amylase en cultivant le microbe sur gélose ordinaire; il semble donc que sa production soit favorisée par la présence de matières amylacées (1).

Lorsqu'on fait digérer l'amidon en solution dans du chlorure sodique à 5 p. 1.000 ou dans la solution minérale :

$(NH^4)^2SO^4$	2	grammes
KNO^3	1	gramme
K^3PO^4	2	—
NaCl	3	—
H^2O	1.000	—

l'analyse, faite après huit à quinze jours, donne les résultats suivants :

Exemple I. — 300 cent. cubes d'empois d'amidon à 3 p. 100, en solution dans du NaCl à 5 p. 1.000, sont ensemencés le 18 avril. Le 26, la culture est filtrée; on recueille 200 cent. cubes de liquide; *la réaction est neutre au tournesol*; à la phénolphtaléine, 1-2 gouttes d'une solution 1/10 N de soude font virer au rouge 10 cent. cubes de filtrat. Celui-ci se colore en brun acajou par l'iode. 4 cent. cubes de filtrat réduisent 10 cent. cubes de liqueur de Fehling titrée à 1 cent. cube = 0,005 gramme de glucose.

Il y aurait, par conséquent, 2,5 grammes de sucre exprimé en glucose; en réalité, il y a mélange de maltose et de glucose : après inversion de 40 cent. cubes de filtrat (3 cent. cubes de HCl fumant, au bain-marie bouillant pendant quatre-cinq minutes) et neutralisation, on a 50 cent. cubes de liquide, dont 3,5 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de liqueur de Fehling, ce qui fait au total 3,55 grammes de glucose. 39,5 °/₀ d'amidon avaient donc été transformés en sucre.

Exemple II. — 300 cent. cubes d'empois d'amidon à 3 p. 100, en solution dans du NaCl à 5 p. 1.000, sont ensemencés le 18 avril; quinze jours plus tard, le 2 mai, la culture est filtrée; on recueille 215 cent. cubes de filtrat, dont la réaction est neutre au tournesol et qui se colore en rouge brun par l'iode; avant l'inversion, 3,9 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de liqueur de Fehling. Après inversion (mêmes conditions que ci-dessus), 3,5 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de Fehling. La culture contient donc 3,75 grammes de glucose, ce qui représente 41,6 p. 100 de l'amidon contenu primitivement (9 gr. à l'état de poudre d'amidon non desséchée). L'amidon resté sur le filtre est desséché dans le vide sur H^2SO^4 et pesé : 4,3 grammes; 4,3 grammes + 3,75 grammes = 8,05 grammes. Comme, d'autre part, l'amidon en poudre desséché perd de 0,8 à 1,2 gramme par 9 grammes, le poids primitif d'amidon était (en moyenne) 9 grammes — 1 gramme = 8 grammes. Nous voyons donc que la totalité de l'amidon consommé se retrouve dans la quantité de sucre

(1) Un fait analogue a été observé par Wortmann (Lafar I, p. 365).

produit (le léger excès de 0,05 gramme est dû, en partie, au toluène ajouté à la culture lors de la filtration, en partie aux erreurs d'analyse.

Lorsque le milieu contient des aliments azotés, la marche de la fermentation est différente. Une partie du sucre formé est attaquée avec production d'acide ; le stade dextrine semble être franchi très rapidement, du moins le liquide de filtration ne se colore-t-il jamais par l'iode ; les résultats de l'analyse sont différents suivant que la fermentation se fait en présence ou en absence de carbonate de chaux.

EXEMPLE III. — Sans carbonate de chaux, 300 cent. cubes du milieu suivant :

Amidon	30	grammes
Bouillon	400	—
Eau	608	—
Peptone Chapoteaut	2	—

sont ensemencés le 22 septembre ; le 30 septembre, la culture est filtrée ; on recueille 245 cent. cubes de filtrat qui ne se colore pas par l'iode ; l'acidité est de 1,6 gramme de H^2SO^4 par litre ; 15 cent. cubes de filtrat réduisent 10 cent. cubes de liqueur de Fehling.

EXEMPLE IV. — Avec carbonate de chaux, ensemencé le 23 septembre, filtré le 4 octobre. Quantité de filtrat, 215 cent. cubes ; ne se colore pas par l'iode ; avant l'inversion, 4 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de Fehling, après l'inversion, 3,5 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de Fehling.

Ce bacille attaque faiblement le glucose, le levulose, le maltose, le saccharose, le lactose ; il donne, avec ces sucres, une acidité correspondant à 1,2 — 1,47 grammes de H^2SO^4 par litre ; dans le lactose, le tiers environ, 0,49 gramme, revient aux acides volatils (acide acétique).

Il se produit, avec ce sucre, une petite quantité d'alcool qui, évalué en alcool éthylique, forme 0,41 p. 100 du liquide de culture (1).

GLYCOBACTER PEPTOLYTICUS.

Ce microbe, isolé de la flore intestinale du chien, est intéressant en ce que, à l'encontre de l'énorme majorité des microbes, doués d'un pouvoir amylolytique marqué (Bac.

(1) C'est Mme Wollman qui a bien voulu se charger de ces déterminations.

mesentericus, bactéridie charbonneuse, vibrion cholérique, vibrion de Finkler-Prior, ainsi que le glycobacter proteolyticus), il n'est pas protéolytique.

Ce microbe est un bâtonnet à bouts fortement arrondis, long de 6 à 7 μ, un peu plus épais que le précédent. Les bâtonnets sont, le plus souvent, isolés, assez rarement disposés par deux.



Fig. 2. — *Glycobacter peptolyticus.*

Culture de vingt heures sur gélose inclinée.

Il se colore bien par les couleurs d'aniline basiques; il garde le Gram (fig. 2).

La formation de spores se fait ici avec une facilité encore plus grande que pour le microbe que nous venons de décrire. On en rencontre déjà un grand nombre dans les cultures de dix-huit heures.

La spore est terminale; au commencement, elle n'entraîne pas la déformation du bâtonnet, mais lorsqu'elle est mûre, son

diamètre peut atteindre le double de celui du bacille. Les spores résistent bien à la température de l'ébullition.

Ce microbe est assez faiblement mobile.

Caractères des cultures.

Sur gélose inclinée, les colonies sont assez régulières, rondes, granuleuses, opaques, à bords clairs.

En gélose glucosée profonde, les colonies sont irrégulièrement rondes, à bords bien délimités; il ne se produit pas de gaz; le milieu s'acidifie légèrement sans devenir opaque.

En bouillon Martin, de même qu'en bouillon blanc d'œuf, la culture n'est pas très abondante; elle débute souvent par un mince voile à la surface; il ne se produit pas d'indol.

En bouillon sucré, il ne se forme pas de voile. Il ne se produit pas de gaz.

Le lait tournesolé est décoloré, mais n'est pas modifié autrement, même au bout d'un temps très long.

La gélatine n'est pas liquéfiée.

Sur pomme de terre, il se forme une strie jaunâtre.

L'amidon est énergiquement liquéfié.

Voici, à titre d'exemple, quelques analyses :

I. — 300 cent. cubes d'empois d'amidon à 3 p. 100 (NaCl 5 p. 1.000) sont ensemencés le 2 avril; le 16 avril, le liquide de culture est filtré; on recueille 210 cent. cubes de filtrat se colorant en bleu par l'iode; celui-ci est neutre au tournesol; à la phénolphtaléine, 0,5 cent. cube de NaOH à 1/100 N neutralise 20 cent. cubes de liquide de filtration; avant l'inversion, 10 cent. cubes de filtrat réduisent 10 cent. cubes de Fehling; après l'inversion (maltose), 4 cent. cubes de filtrat réduisent 10 cent. cubes de Fehling, ce qui correspond à 2,6 grammes de glucose.

Le poids initial d'amidon desséché dans le vide était de 7,8 grammes, et celui de l'amidon non utilisé dans les mêmes conditions, 4,6 grammes.

II. — 300 cent. cubes d'empois d'amidon à 3 p. 100 dans du NaCl à 5 p. 1.000 sont ensemencés les 25 avril; filtré le 10 mai; recueilli 210 cent. cubes de filtrat qui se colore en bleu violet par l'iode; il est neutre au tournesol; 10 cent. cubes de ce filtrat réduisent 10 cent. cubes de Fehling; après inversion, 4 cent. cubes réduisent 10 cent. cubes de Fehling, ce qui correspond à 2,6 grammes de glucose.

Le poids de l'amidon desséché dans le vide avait été primitivement de 7,8 grammes; celui de l'amidon non consommé dans les mêmes conditions est de 4,8 grammes.

Les sucres ne sont attaqués, d'une façon appréciable, qu'en

présence d'aliments azotés; c'est ainsi que le bouillon-amidon, de même que le bouillon glucosé, donne une acidité de 2,4 grammes de H^2SO^4 par litre. Sur ces 2 gr. 4, environ 0,3 gramme par litre reviennent aux acides volatils (acide acétique (?), réaction du chlorure ferrique).

Les différents sucres donnent sensiblement la même acidité.

Je décrirai ici un fait que j'ai eu l'occasion d'observer chez plusieurs autres microbes sporulés (et notamment chez le *glycobacter proteolyticus*), mais que j'ai étudié de plus près pour le microbe qui nous occupe.

Lorsqu'on réensemence à plusieurs reprises un microbe sporulé à un moment où — une partie ayant déjà donné des spores — la grande majorité des microbes est encore à l'état végétatif (18-20 heures pour le *glycobacter peptolyticus*; 24-30 heures pour le *glycobacter proteolyticus*), on remarque, après un certain nombre de repiquages, que les spores se forment de plus en plus tardivement; il est très probable qu'en espaçant de plus en plus les repiquages et en poursuivant l'expérience assez loin, on arriverait à supprimer (au moins pendant un temps très long) la formation de spores (fig. 3, 4, 5).

L'explication de ce fait est probablement la suivante : lorsqu'on réensemence souvent un microbe dans les conditions indiquées, il se fait une sélection d'individus ayant le moins d'aptitudes à sporuler, car les spores mettant un temps plus ou moins long à germer, les individus asporogènes se multiplient beaucoup plus rapidement et forment, dans les cultures successives, une proportion de plus en plus considérable. On élimine ainsi les individus qui ont une tendance à sporuler rapidement. En espaçant ensuite les repiquages, on élimine de même ceux qui donnent des spores plus tardivement.

J'ai pu arriver ainsi, après vingt repiquages (d'abord à 20 heures, ensuite à 48 heures environ d'intervalle), à avoir des cultures où la sporulation commençait seulement au bout de huit jours, tandis que, normalement, chez ce microbe, elle est déjà abondante après 18 heures de culture.

Ce qui confirme l'explication que je viens de donner du mécanisme de ce phénomène, c'est le fait que l'aptitude à la sporulation n'est guère influencée par les repiquages répétés, lorsque ceux-ci sont trop fréquents (toutes les 12 heures), c'est-



FIG. 3. — *Glycobacter peptolyticus.*

Culture de vingt-quatre heures sur gélose inclinée : *n*, souche primitive ; *a*, souche modifiée par 10 repiquages successifs.

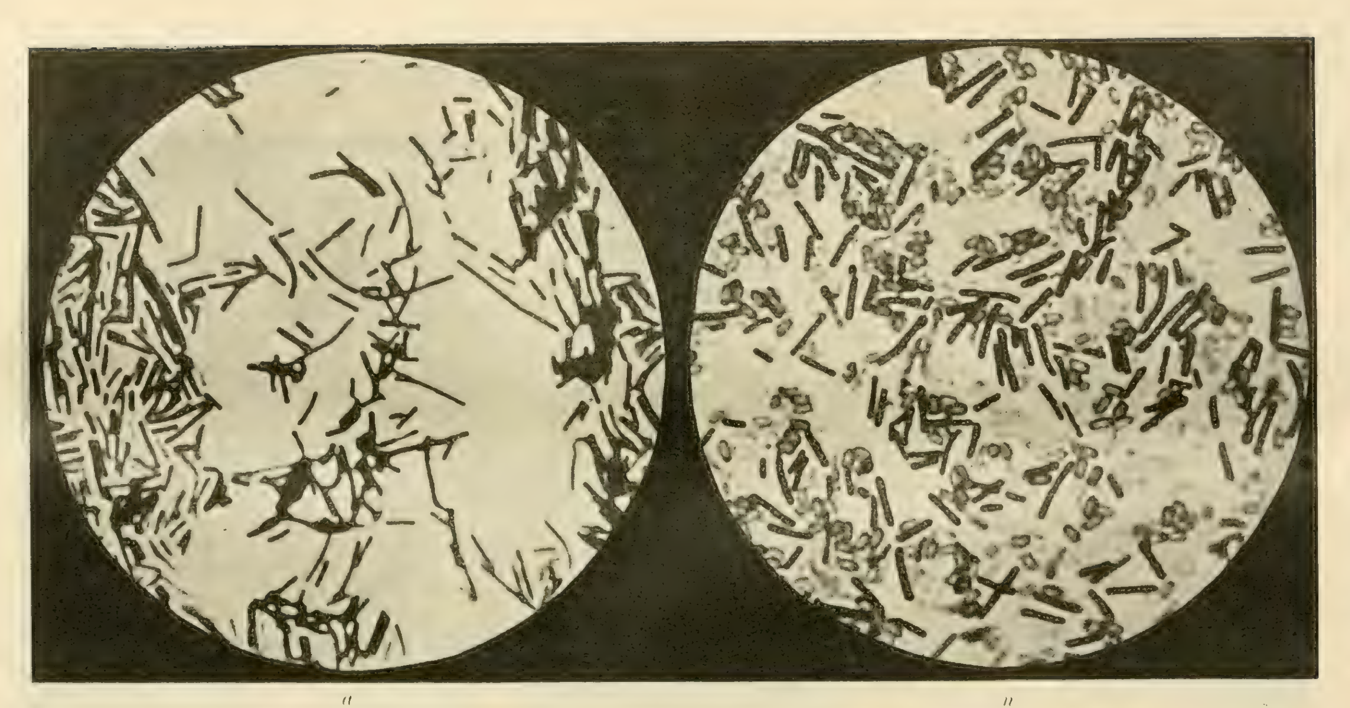


Fig. 4. — *Glycobacter peptolyticus.*

Culture de quarante-huit heures : *n*, souche primitive; *a*, souche modifiée par 10 repiquages.

à-dire quand il n'y a encore presque pas de spores), ou, au contraire, trop espacés (toutes les 48 heures), lorsque la très grande majorité des microbes ont déjà sporulé.

Quant aux autres microbes amylolytiques étudiés, je ne ferai que citer un bacille en filaments très longs, anaérobie strict, isolé chez la poule et un autre qui, par ses propriétés, doit être



Fig. 5. — *Glycobacter peptolyticus.*

Culture âgée de huit jours; souche modifiée par une vingtaine de repiquages. La grande majorité des microbes est morte et ne prend plus le Gram, on voit de nombreuses formes d'involution.

rapproché du *glycobacter peptolyticus* et qui a été isolé au cours de recherches entreprises dans un but différent, d'une macération de topinambour : à côté de son pouvoir amylolytique, ce microbe possédait celui de désagréger énergiquement le papier Berzelius.

Malheureusement, lorsque, rentré des vacances, j'ai voulu reprendre son étude, je n'ai pu reproduire cette expérience :

le microbe, probablement à la suite de conservation dans un milieu non approprié, avait perdu sa propriété d'attaquer la cellulose. Le fait s'observe du reste avec les microbes amylolytiques : lorsqu'on les conserve en faisant des passages de gélose en gélose, leur pouvoir amylolytique baisse. Inversement, on réussit à les renforcer en faisant des passages successifs sur amidon : la saccharification, sans être plus complète, se fait plus rapidement.

ÉTUDES SUR LE BACILLE DE SCHMORL (1)

(PREMIER MÉMOIRE)

ROLE PATHOGÈNE — MORPHOLOGIE — CULTURES BIOLOGIE — ISOLEMENT

par E. CÉSARI et V. ALLEAUX.

Aperçu, pour la première fois, par Löffler (1884) dans la diphtérie des veaux, le microbe qui nous occupe a été retrouvé ensuite (1891), par Schmorl, dans des foyers mortifiés de la face chez les lapins. Mac Fadyean (1891) constata sa présence au sein de nécroses hépatiques des bovidés et du mouton et Bang (1891) démontra l'identité des germes étudiés par ses prédécesseurs. Puis, Jensen (1895) établit le rôle pathogène important de ces germes dans une foule d'affections animales.

Nous ne suivrons pas ici le développement ultérieur de la question. Nous ferons simplement remarquer que les divers auteurs qui ont écrit sur le bacille de Schmorl (*ou bacille de la nécrose*) sont unanimes à signaler les lacunes de son histoire. C'est précisément ce qui nous a incité à reprendre *de plano* l'étude de cet organisme si curieux.

RÔLE PATHOGÈNE

Il faut se représenter le bacille de Schmorl comme un microbe qui passe tour à tour du milieu extérieur dans le tube digestif des herbivores et *vice versa*. Tel est le cycle habituel de son existence saprophytique, laquelle l'entretient à l'état vivant et actif, malgré l'absence de spore. Son rôle pathogène commence dès qu'il pénètre dans l'intimité des tissus, après avoir franchi les barrières épidermiques ou épithéliales. Et

(1) Nous croyons équitable de le nommer ainsi, parce que ce sont les recherches de Schmorl qui l'ont fait connaître tout d'abord.

voici comment se traduit alors sa végétation *in vivo* chez les diverses espèces sensibles.

CHEVAL. — Le bacille de Schmorl constitue le principal agent des lésions nécrotiques des extrémités chez cet animal : nécrose du fibro-cartilage de la 3e phalange (javart cartilagineux), — inflammations podophylliennes, compliquées de mortification des tissus (bleime, seime), ténosite nécrosante (javart tendineux). On le retrouve, généralement à l'état de pureté, au sein des foyers nécrotiques ou suppurés des poumons, complications métastatiques fréquentes des affections dont nous venons de parler. Il se rencontre aussi dans la nécrose de la hanche (gangrène de décubitus) et dans celle du ligament cervical (mal de nuque, mal d'encolure, mal de garrot). Enfin, il a été signalé au sein d'exsudats diphtériques de l'intestin, dans un foyer nécrotique du myocarde, etc.

BOEUF. — Le bacille de Schmorl occasionne la stomatite gangreneuse et l'entérite diphtérique des veaux, — la vagino-métrite diphtérique des vaches, — des abcès de la panse et des ulcères du feuillet, — des lésions nécrotiques ou suppurées du foie et des poumons, — de graves mortifications du pied (gangrène des onglons, panaris, limace, piétin, mal de pied contagieux), — la nécrose enzootique de la queue, etc... Il est fort probable, également, qu'on doit rapporter au germe qui nous occupe les poussées gangreneuses qui aggravent si souvent les localisations podales de la fièvre aphteuse.

MOUTON. — Le bacille de la nécrose provoque, chez cet animal, une affection enzootique qui se traduit par des ulcérations des lèvres, du nez et des membres; on le rencontre aussi dans des abcès hépatiques et il faut voir en lui l'agent des maladies nécrotiques de l'ongle, le piétin en particulier.

PORC. — Le bacille de Schmorl a été trouvé dans la stomatite diphtérique, la gangrène de la cloison nasale, les ulcérations intestinales, etc.

CHIEN. — Le bacille de la nécrose serait la cause d'une dermatite phlegmoneuse et fistuleuse très spéciale.

LAPIN. — Le bacille qui nous occupe est l'agent de la « maladie de Schmorl », ou nécrose envahissante du nez et des lèvres. On l'a noté aussi dans des lésions variées, notamment dans des foyers pulmonaires infarciformes.

Le bacille de la nécrose a été rencontré chez d'*autres espèces animales*, mais à titre purement fortuit. On a même constaté sa présence chez l'homme. Il a déterminé, par infection accidentelle, de petits abcès du doigt chez Schmorl et son garçon de laboratoire.

Notons, une fois pour toutes, que son rôle pathogène, *au moins exclusif*, n'est nullement établi avec rigueur dans l'ensemble des affections citées plus haut.

En somme, le bacille de Schmorl engendre : *du côté des tissus externes*, des affections nécrotiques ou gangreneuses et, quelquefois, des altérations de nature suppurative, — *du côté des muqueuses*, des affections, improprement nommées diphtériques (répondant aux nécroses des tissus externes), qui offrent volontiers le caractère térébrant et gangreneux et, quelquefois,

des altérations de nature suppurative, — enfin, *du côté des viscères*, des nécroses ou des abcès. Nous rappellerons que, depuis les remarquables travaux de Veillon, il n'est plus permis de confondre la *nécrose*, qui représente la mortification des tissus, avec la *gangrène*, qui représente leur putréfaction *in vivo*, et que *cette dernière demeure l'apanage des microbes anaérobies* (lesquels peuvent, d'ailleurs, se borner à déterminer de simples nécroses). Le bacille de Schmorl, *anaérobie*, est capable d'occasionner, selon les cas, des mortifications *ou* des gangrènes au niveau des tissus externes et des muqueuses; par contre, au niveau des viscères, il ne provoque *jamais* de putréfaction *in vivo*.

Les lésions dues au microbe qui nous occupe se classent donc finalement en deux catégories distinctes : *nécroses* (compliquées ou non de gangrène) et *processus suppuratifs*. Dans les deux cas, la fréquence des *thrombo-phlébites* explique aisément celle des *métastases* qui, selon la voie offerte à la migration des germes, apparaissent soit au niveau du *foie*, soit au niveau des *poumons*.

Les échantillons du bacille de la nécrose qui ont servi à nos recherches provenaient de chevaux atteints de *javart* (foyers pulmonaires métastatiques). Ils peuvent être considérés pratiquement comme identiques entre eux; les quelques différences observées, d'ailleurs fort légères, seront mentionnées en passant.

MORPHOLOGIE

Dans les produits pathologiques naturels (1), comme dans les lésions expérimentales et les cultures, le bacille de Schmorl offre des aspects assez variés que l'on peut ramener à deux types principaux, le *type allongé* (filamenteux) et le *type court*, dont la filiation se trouve facilement établie par l'examen des cultures où l'on voit le second succéder au premier.

La forme allongée, la plus commune, *est vraiment caractéristique du bacille de la nécrose*. Elle ne fait jamais défaut dans

(1) Nous en avons examiné *histologiquement* un grand nombre, tant chez le cheval que chez le bœuf.

les lésions en voie d'extension et prédomine dans les lésions récentes. En culture, c'est elle qui apparaît au début du développement, quand on s'adresse aux milieux liquides et surtout aux milieux liquides glucosés. Elle se manifeste par de longs filaments, droits ou flexueux, parfois repliés sur eux-mêmes, souvent enchevêtrés. Des filaments entrecroisés peuvent, *à un examen très superficiel*, simuler des formes ramifiées, d'où



Fig. 1. — B. de Schmorl (type allongé et type court) dans les produits pathologiques (foyer de nécrose métastatique du poumon d'un cheval atteint de javart). Giemsa. Gr. : 1.800.

l'erreur de certains auteurs qui ont classé le bacille de Schmorl dans le groupe des Streptothricées; un peu d'attention suffit pour éliminer cette interprétation. La *longueur des filaments* est extraordinairement variable. Au sein des lésions, elle atteint en moyenne 10-20 μ, mais il n'est pas rare de rencontrer des éléments offrant jusqu'à 50-100 μ et plus. En culture (milieux liquides), on obtient des filaments excessivement longs et difficiles à mesurer en raison de leur enchevêtrement; ils occupent souvent plusieurs champs microscopiques (nous

en avons observé un qui atteignait 360 μ). *La largeur des filaments*, qui oscille entre 0 μ 7 et 1 μ, peut dépasser 2 μ chez les formes renflées dont on parlera dans un instant. Les types allongés sont habituellement constitués par une gaine très fine, enveloppant un protoplasme clair, qui se condense, de place en place, en granulations chromatiques. Selon les éléments, ces granulations s'espacent plus ou moins ou confluent,

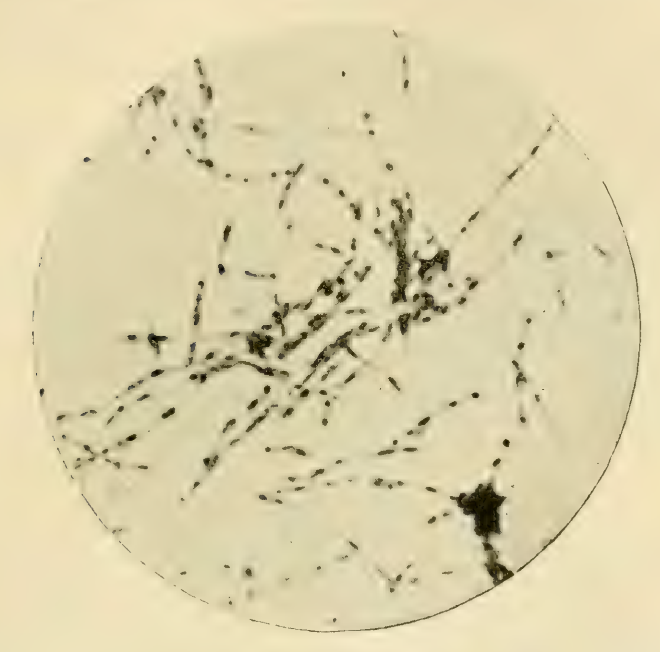


Fig. 2. — B. de Schmorl. (Culture de vingt-quatre heures en bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000.) Fuchsine phéniquée. Gr. : 1.800.

au contraire, jusqu'à s'accoler véritablement. On rencontre assez souvent, dans les préparations, des filaments qui semblent avoir subi un mouvement de torsion sur eux-mêmes.

Rarement (lésions d'inoculation chez le lapin, cultures en milieux pauvres), on observe des éléments irréguliers, d'habitude longs et épais, à protoplasme finement granuleux, contenant des vacuoles. Ces éléments, dépourvus de corpuscules chromatiques, présentent parfois sur leur trajet des renflements en fuseau, ou bien se terminent par des massues analogues aux chlamydospores de certaines algues.

Quand on suit le développement du bacille de Schmorl dans les milieux liquides, on constate que les filaments se fragmentent en articles de plus en plus courts. Au sein des vieilles cultures, qui offraient tout d'abord uniquement des formes allongées, on ne retrouve à un moment donné que des éléments de 2 à 3 μ de longueur. Ces formes courtes résultent donc de la division des filaments. Le type court se rencontre dans les lésions anciennes, comme dans les vieilles cultures. Certains échantillons du bacille de la nécrose (ceux dont le pouvoir fermentatif vis-à-vis du glucose est peu marqué) poussent d'emblée sous la forme courte en milieu liquide.

Le bacille de Schmorl est immobile et n'offre pas trace de cils. Il ne donne point de spores, ainsi que le démontrent l'étude histologique et le chauffage des cultures. Il se teint par les couleurs basiques d'aniline; mais, tandis que les éléments jeunes fixent ces dérivés avec intensité, les cellules âgées se colorent très mal. La thionine phéniquée et le Ziehl dilué teintent fort bien les granulations et le Giemsa leur imprime une belle métachromasie.

Le bacille de la nécrose se décolore par la méthode de Gram.

Cultures.

Pour « travailler » avec le bacille de Schmorl, on est, *pratiquement*, obligé de se servir de cultures en milieu liquide ; cultures, bien entendu, anaérobies. L'anaérobiose est obtenue, sans difficulté, par l'emploi combiné du vide et de l'hydrogène ; nous ne saurions trop recommander, à ce point de vue, le dispositif excessivement pratique dû à M. Legroux et résumé *à la suite de ce travail*. Le meilleur milieu liquide est le bouillon Martin, glucosé ou non selon le but que l'on se propose, bouilli dix minutes (puis refroidi) avant l'ensemencement. Ceci posé, nous allons indiquer les caractères essentiels du bacille de la nécrose cultivé, à 37 degrés, dans les divers milieux usuels, où il pousse aisément à l'abri de l'air.

Bouillon Martin. — On obtient, en dix-douze heures, un trouble uniforme du liquide. L'agitation fait apparaître des ondes soyeuses, moirées, en même temps qu'elle provoque le

dégagement de quelques bulles gazeuses. Au bout de vingt-quatre heures, un dépôt blanc sale, crayeux, tassé, adhère au fond du tube. Après trois-quatre jours, tous les germes se sont déposés et le milieu demeure indéfiniment limpide. Les cultures dégagent une odeur spéciale, pénétrante et très désagréable, celle du *javart* exactement.

Bouillon Martin, glucosé à 2 p. 1.000. — L'abondance est



Fig. 3. — B. de Schmorl. (Formes renflées.
Lésions d'inoculation chez le lapin.) — Fuschsine phéniquée. Gr. : 1.800.

plus grande que dans le bouillon Martin simple et le dégagement gazeux plus considérable (le liquide, non agité, apparaît toujours surmonté d'une collerette mousseuse). Le milieu devient très faiblement acide. Certains échantillons fermentent peu et ne gagnent guère à être cultivés en bouillon Martin glucosé ; il est à noter que, dans ce milieu, comme dans le précédent, ils poussent d'emblée agglutinés (et sous la forme courte).

Sérum liquide. — On voit apparaître, après quarante-huit heures, des flocons épais, nuageux, qui flottent dans le liquide

et se déposent peu à peu au fond du tube. Le sérum n'est ni coagulé, ni fluidifié.

Lait. — Il se caille, du 4e au 6e jour, par acidification.

Gélatine (à 10 p. 100, au bouillon Martin). — Dans ce milieu, maintenu à 37 degrés, se forment, comme dans le sérum, des flocons épais qui ne tombent que lentement à cause de la viscosité du liquide. La gélatine n'est nullement attaquée, car elle fait prise au sortir de l'étuve.

Gélose (au bouillon Martin). — Sur la *gélose inclinée*, naissent de petites colonies isolées, à bords déchiquetés, semi-transparentes et légèrement brunâtres. — Dans la *gélose* ensemencée *par piqûre*, on observe un axe grisâtre, d'où partent des prolongements boursouflés, irréguliers, « lichénoïdes ».

Sérum coagulé. — *En strie*, c'est une traînée grisâtre, à bords sinueux, finement ridée à sa surface. — *En piqûre*, si le milieu a été coagulé à la température minima (de façon à obtenir une gelée transparente), c'est un aspect rameux, rappelant un peu le « sapin renversé » de la bactéridie charbonneuse.

Pomme de terre. — Nous n'avons pas obtenu de culture.

Biologie.

Le bacille de Schmorl est un *anaérobie strict*. On peut, cependant, obtenir sans difficulté des cultures à l'air, dans les milieux liquides (non bouillis), quand on l'y ensemence avec des aérobies stricts (*b. subtilis* — procédé de M. Roux) ou facultatifs (bacille du rouget). Le *b. subtilis* agit en absorbant l'oxygène du milieu lors de son développement et en maintenant l'anaérobiose, mécaniquement et biologiquement, sous son voile une fois formé. Le bacille du rouget joue le rôle d'un minuscule appareil à hydrogène sulfuré (on sait qu'il produit H^2S — et des mercaptans — aux dépens des peptones). Sur le conseil de M. M. Nicolle, nous avons entrepris de remplacer le bacille du rouget par le sulfure de calcium. Ce composé, stérilisé en tube ouvert à 180 degrés et ajouté, à l'état de traces, au bouillon Martin (glucosé à 0,2 p. 100)

ou au milieu T (1), permet un développement facile du bacille de la nécrose *sans la moindre précaution*.

Les milieux au sulfure de calcium nous ont rendu les plus grands services pour isoler le bacille de Schmorl et pour en « remonter » les cultures affaiblies (voir plus loin). Dans le bouillon Martin au sulfure de calcium, soit dit par anticipation, le bacille de la nécrose donne une toxine aussi active que dans le bouillon Martin soumis à l'action du vide et de l'hydrogène ; il en va de même pour le bacille tétanique (*expériences inédites*).

Le bacille de Schmorl croît de 30 à 40 degrés ; l'optimum se place entre 37 et 38 degrés. Il ne pousse pas dans les milieux acidifiés, même modérément. Il fermente le glucose et le lactose (parfois faiblement), mais n'attaque ni le saccharose, ni la glycérine. Il ne jouit point du moindre pouvoir protéolytique (la gélatine, avons-nous vu, n'est même pas liquéfiée). Il produit de l'indol et dégage l'odeur fétide mentionnée plus haut et que M. Alilaire attribue à la présence de mercaptans.

Les cultures conservent leur vitalité, à la température ordinaire, *en bouillon Martin simple*, pendant plusieurs mois. Elles meurent à 37 degrés, *en bouillon Martin glucosé*, après une semaine environ.

Isolement.

Il n'offre guère de difficultés, quand on part de produits où le bacille de Schmorl existe en abondance et presque à l'état pur. Sinon, il devient, cela va de soi, d'autant plus ardu que les germes sont moins nombreux et accompagnés d'une quantité plus grande de microbes étrangers, notamment d'anaérobies.

Dans le premier cas, on obtient souvent des cultures pures d'emblée par ensemencement en milieux liquides additionnés de sulfure de calcium. Si les tubes d'origine sont encore souillés de quelques impuretés, on arrive généralement à s'en débar-

(1) Milieu employé par MM. Truche et Cotoni dans leurs recherches sur le pneumocoque et ainsi formulé : peptone Chapoteaut 4 p. 100 ; glucose 0,2 p. 100 ; sel marin 0,5 p. 100 (on alcalinise jusqu'à coloration violet franc au tournesol).

rasser grâce à un petit nombre de passages en milieu sulfuré, répétés à court intervalle.

Dans le second cas, il faut recourir au procédé classique de Veillon, mais on facilite grandement la réussite quand on fait une culture préalable en milieu sulfuré, « culture d'enrichissement » qui assure la prédominance du bacille de la nécrose. Dans les premiers tubes d'une « série Veillon », la gélose est toujours disloquée par les gaz de fermentation ; dans les derniers, on trouve des colonies isolées, lenticulaires ou glomérulaires, opaques, d'un blanc grisâtre, qui apparaissent du 3e au 5e jour et atteignent, au plus, le volume d'une tête d'épingle.

Le bacille de Schmorl étant isolé, on peut l'ensemencer dans le bouillon Martin simple ou dans le bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000. Indiquons, nettement, les avantages et inconvénients respectifs de ces deux milieux. Dans le bouillon Martin simple, les cultures sont moins abondantes et souvent « capricieuses » (1) ; alors même que l'on fait des passages réguliers (*in vitro*), on n'est jamais sûr d'obtenir un développement en vingt-quatre heures et de temps en temps il faut, pour « remonter » les microbes devenus paresseux, recourir à un passage en milieu sulfuré. Par contre, grâce à l'absence de toute acidification, le bouillon Martin simple constitue le milieu d'élection pour conserver les germes (lorsque ceux-ci sont un peu vieux, ils ne « repartent » que dans les liquides sulfurés). — Dans le bouillon Martin glucosé, les cultures sont plus abondantes et se font régulièrement ; on est toujours sûr d'obtenir un développement en vingt-quatre heures avec des germes tant soit peu entraînés. Le bouillon Martin glucosé constitue donc le milieu d'élection pour les cultures qui suivent l'isolement et pour le travail courant. En somme, on l'emploiera dans tous les cas usuels, la conservation exceptée.

(1) *Au fond*, c'est le cas de tous les anaérobies, cultivés dans le bouillon Martin non glucosé.

MODIFICATIONS A L'APPAREIL VIDE-HYDROGÈNE

POUR

LES CULTURES ANAÉROBIES EN MILIEUX LIQUIDES

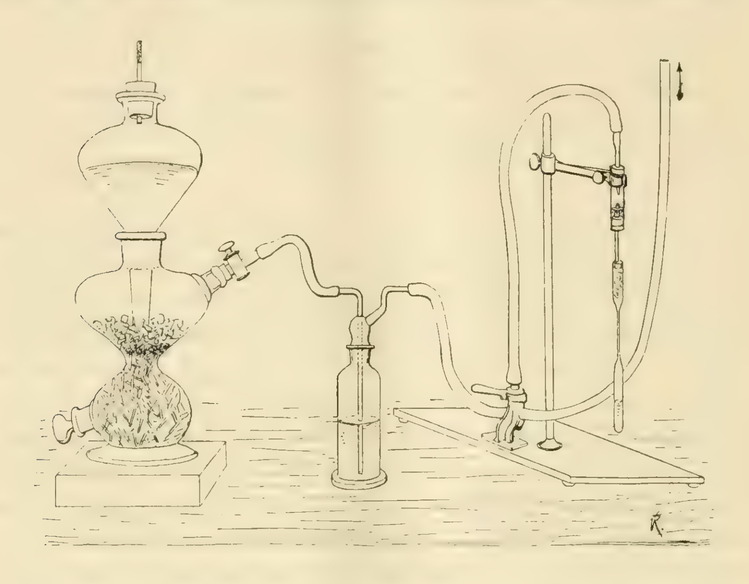
par RENÉ LEGROUX.

L'appareil, nécessitant l'emploi du vide et de l'hydrogène, décrit par M. Roux en 1887, et qui, depuis, n'a cessé d'être utilisé couramment pour les cultures anaérobies, présente deux inconvénients que nous avons cherché à éviter. La manœuvre successive de deux robinets, pour l'arrivée de l'hydrogène et pour le vide, est incommode lorsqu'il faut opérer rapidement. D'autre part, les canalisations sont souvent remplies par l'eau due à l'évaporation, sous le vide, des bouillons de culture; cette eau, chassée par le courant d'hydrogène, mouille le coton et parfois pénètre jusqu'au milieu nutritif.

Nous remplaçons les deux robinets par un seul, branché à la suite de l'appareil producteur d'hydrogène (appareil de Kipp, appareil de Roux, etc.); ce robinet a trois voies, deux latérales, une verticale. Par la voie latérale gauche, on relie le robinet au flacon laveur de Durand et l'on met en communication la voie latérale droite avec la trompe à eau. La partie centrale tournante du robinet porte une tétine où sort la voie verticale; cette voie met alternativement en relation les voies latérales avec le tube de culture. Une seule manette, assez longue, commande ces différents temps.

Afin d'éviter la présence de l'eau dans la canalisation, il est d'abord préférable d'employer des tuyaux de caoutchouc à vide et non des tuyaux métalliques; puis, on placera à l'extrémité du caoutchouc destinée à porter le tube de culture un réservoir condensateur de vapeur d'eau. Ce réservoir doit être petit, pour ne pas prendre trop d'hydrogène à l'appareil producteur; il doit être démontable, afin d'être facilement vidé; on le réalise avec un tube de verre de 15 millimètres de diamètre et de 7 centimètres de long; les deux ouvertures reçoivent chacune

un bouchon de caoutchouc traversé par un petit tube de verre effilé à chaque extrémité; l'effilure traversant le bouchon inférieur devra pénétrer dans le tube condensateur de 2 à 3 centimètres, de manière à permettre la collection de l'eau et à



empêcher son reflux dans le tube de culture. Le bouchon supérieur est relié à la canalisation partant de la voie verticale du robinet; le bouchon inférieur est relié, par l'intermédiaire d'un autre bouchon de caoutchouc, au tube de culture.

Il y a avantage, pour hâter le vide dans le milieu, à se servir d'un jet de gaz à flamme bleue, lequel permet en outre de sceller plus rapidement le tube et de ne pas noircir la verrerie.

MORTALITÉ PAR LA VARIOLE, EN SUÈDE DE 1776 A 1875

par ALFRED PETTERSSON.

(Travail du laboratoire bactériologique de l'Institut médical public de Stockholm.)

La loi de 1686 sur les cultes enjoignit au clergé suédois de tenir, dans les paroisses, des registres sur les mariages, les naissances et les décès. Peu après cette date, on eut l'idée d'utiliser ces registres pour établir une statistique sur le pays tout entier. Cette statistique remonte au milieu du XVIII[e] siècle. A partir de 1749, des tableaux réguliers et complets furent élaborés sur le mouvement de la population : les naissances et les décès, etc., y furent indiqués. Les rapports relatifs à la mortalité devaient, en plus de l'âge, dénoncer aussi la cause des décès. Grâce à cette disposition, on réussit à recueillir des matériaux d'une haute valeur scientifique pour l'étude des maladies contagieuses, et on est à même de fixer la fréquence et la propagation de plusieurs d'entre elles à partir de 1749.

En ce qui concerne la variole, cette maladie fut englobée, dans les rapports, avec la rougeole jusqu'en 1774, année où les deux maladies furent traitées séparément. A partir de cette époque, on est donc à même de déterminer la mortalité par la variole, étude qui est d'un grand intérêt, d'autant plus qu'elle nous permet de constater l'influence de la vaccination sur la mortalité par cette maladie. Aussi s'est-on souvent servi de cette statistique dans ce but, et, ce qui est surprenant, non seulement les partisans de la vaccination, mais aussi ses adversaires, y ont eu recours. En général, on s'est contenté de comparer la mortalité causée par la variole avant et après que la vaccination fut établie. Comme cette mortalité était déjà en décroissance avant la vaccination, cette comparaison, comme nous allons le voir, ne présente pas un argument tout à fait irréfutable. On s'en est servi pour prouver deux conclusions parfaitement opposées, à savoir : la valeur préventive ou bien

l'impuissance plus ou moins complète de la vaccination vis-à-vis de la variole.

Mais on peut aussi examiner la répartition des décès sur les diverses catégories d'âge avant et après l'établissement de la vaccination. Au cas où, après la vaccination, les décès surviennent dans de tout autres catégories qu'auparavant, on a toute raison de croire que la vaccination est la cause de ce changement. J'ai traité mon sujet aussi à ce point de vue. La variole étant d'une fréquence peu considérable en Suède depuis l'année 1876, mes recherches ne sont pas allées au delà de cette époque. Pour me limiter à un laps de temps d'un siècle, je n'ai commencé mes recherches qu'à partir de 1776. Les rapports recueillis au Bureau central de Statistique de Suède indiquent, jusqu'en 1801, les décès par tranches d'âge de cinq années. Le premier groupe, celui de 0 à 5 ans, est divisé en trois sous-groupes : de 0 à 1 an, — de 1 à 3 ans, et de 3 à 5 ans. A partir de l'année 1802 jusqu'en 1859, les rapports ne traitent, au-dessus de dix ans, que les groupes de 10 à 25, de 25 à 50 et celui d'au-dessus de 50 ans. Depuis 1860, on a à sa disposition les données fournies par les registres paroissiaux.

Ne pouvant disposer tous les matériaux par tranches d'âge de cinq ans (cette disposition est celle qui offre le plus d'intérêt pour ces recherches), j'ai pourtant gardé cette disposition autant que possible. Pendant la période 1801-1860 seulement, les tranches de cinq ans sont remplacées par les tranches plus larges mentionnées ci-dessus. Je donne, en outre, un aperçu des matériaux répartis seulement en ces larges tranches. Les grandes épidémies ne revenaient (voir le tableau I) qu'à de longs intervalles, de durée très différente. Pour obtenir des résultats exacts, les périodes dans les limites desquelles on veut comparer la mortalité ne doivent pas être trop courtes. C'est pourquoi, dans ce tableau, j'ai divisé les matériaux en périodes décennales.

La vaccination fut pratiquée en Suède pour la première fois en 1801. La vaccination obligatoire est établie depuis 1816. Dans la période quinquennale 1801-1805, le nombre des vaccinés s'éleva à 47.258, soit 13 p. 100 de tous les enfants nouveau-nés. Dans la période 1806-1810, 25 p. 100 des nouveau-nés ont été vaccinés, et, de 1811 à 1816, la proportion s'est

élevée à 44 p. 100. Voilà un fait qui doit être considéré comme un très bon résultat produit par la vaccination volontaire. On ne se trompera pas en considérant la rapide propagation de la vaccination comme un effet dû à l'effort employé antérieurement pour propager la variolisation. On a prétendu que la variolisation ne fut jamais d'un emploi fréquent en Suède. La première inoculation fut pratiquée en 1754 à Upsal. Quoique le peuple s'y opposât obstinément, les médecins départementaux se donnèrent beaucoup de peine pour la répandre.

Tableau I. — **Décès par la variole de 1776 à 1875.**

ANS	CAS de mort.	ANS	CAS de mort.	ANS	CAS de mort.	ANS	CAS de mort.
1776 . . .	1.500	1801 . . .	6.057	1826 . . .	625	1851 . . .	2.488
1777 . . .	1.943	1802 . . .	1.533	1827 . . .	600	1852 . . .	1.534
1778 . . .	6.607	1803 . . .	1.464	1828 . . .	257	1853 . . .	279
1779 . . .	15.102	1804 . . .	1.450	1829 . . .	53	1854 . . .	204
1780 . . .	3.374	1805 . . .	1.090	1830 . . .	104	1855 . . .	41
1781 . . .	1.485	1806 . . .	1.482	1831 . . .	612	1856 . . .	52
1782 . . .	2.482	1807 . . .	2.129	1832 . . .	622	1857 . . .	560
1783 . . .	3.915	1808 . . .	1.814	1833 . . .	1.145	1858 . . .	1.289
1784 . . .	12.453	1809 . . .	2.404	1834 . . .	1.049	1859 . . .	1.470
1785 . . .	5.080	1810 . . .	824	1835 . . .	445	1860 . . .	708
1786 . . .	671	1811 . . .	698	1836 . . .	138	1861 . . .	193
1787 . . .	1.771	1812 . . .	404	1837 . . .	361	1862 . . .	148
1788 . . .	5.460	1813 . . .	547	1838 . . .	1.805	1863 . . .	307
1789 . . .	6.764	1814 . . .	308	1839 . . .	1.934	1864 . . .	741
1790 . . .	5.893	1815 . . .	472	1840 . . .	650	1865 . . .	1.336
1791 . . .	3.101	1816 . . .	690	1841 . . .	237	1866 . . .	1 217
1792 . . .	1.939	1817 . . .	242	1842 . . .	58	1867 . . .	1.061
1793 . . .	2.103	1818 . . .	305	1843 . . .	9	1868 . . .	1.429
1794 . . .	3.964	1819 . . .	161	1844 . . .	6	1869 . . .	1.474
1795 . . .	6.740	1820 . . .	143	1845 . . .	6	1870 . . .	764
1796 . . .	4.493	1821 . . .	37	1846 . . .	2	1871 . . .	329
1797 . . .	1.754	1822 . . .	11	1847 . . .	13	1872 . . .	346
1798 . . .	1.357	1823 . . .	39	1848 . . .	71	1873 . . .	1.122
1799 . . .	3.756	1824 . . .	618	1849 . . .	341	1874 . . .	4.063
1800 . . .	12.032	1825 . . .	1.243	1850 . . .	1.376	1875 . . .	2.019

Les rapports présentés à la diète de 1761 à 1769 (1) men-

(1) *Berättelser rörande provincialdoktorernas ämbetsförrättningar.* Stockholm, 1761, *Berättelser rörande medicinalverkets tillstand*, 1765 et 1769. Je dois la connaissance de ces rapports à M. E. Almquist.

tionnent souvent des cas de variolisation. Par un seul médecin, désigné par le Conseil supérieur de santé, 275 variolisations furent effectuées. A Stockholm ; à Gothembourg et à Christianstad fonctionnaient même, pendant quelque temps, des hôpitaux spéciaux de variolisation. Après cette date, les rapports exacts font défaut.

En tout cas la variolisation, sans être générale, devint probablement de plus en plus fréquente. En certains endroits du moins, à la fin du XVIIIe siècle, elle paraît avoir été très répandue. A Gothembourg, à cette époque, presque tous les enfants furent variolisés. En 1794, selon Almquist (1), la variole fut inoculée par Carlander à 300-400 enfants, et, en 1799, à 600 enfants environ. A cette époque, les naissances de la ville n'étaient que de 400 à 500 par an. Il est évident que l'inoculation de la variole a bien préparé la population à la vaccination, traitement plus doux, mais aussi moins efficace.

En examinant les cas de mort par la variole, on constate que la mortalité baissa rapidement à partir de 1801, et qu'après 1810 elle fut, en général, très faible jusqu'à la période 1865-1875. Cette diminution devient encore plus marquée, si l'on compare le nombre des décès avec la population, dont le chiffre avait naturellement augmenté pendant ce laps de temps. Le tableau IV indique le nombre des décès sur 100.000 habitants dans les divers groupes d'âge. Pour effectuer ce calcul, j'ai consulté la « Population moyenne », par M. Gustav Sundbärg (2).

La vaccination commença en Suède à la fin de l'année 1801. Cependant, on ne peut pas attribuer la diminution de la mortalité par la variole, après cette époque, à la vaccination seule. Déjà, avant qu'elle fût employée, la mortalité était en décroissance.

Dans la période 1776-1780, 274,8 sur 100.000 habitants moururent par la variole, et, dans les trois périodes quinquennales suivantes, 237,4, 190,2 et 160,4. Dans la période 1796-1800, la mortalité montait à 200,8 par suite de la grande épidémie de 1800, mais elle diminua promptement de nouveau, de sorte qu'elle n'atteignit que 97,3 décès sur 100.000 habitants dans la période 1801-1805.

(1) Almquist (E.), Bihang till Göteborgs *hälsovardsnämds arsberättelse*, 1889.
(2) Sundbarg (Gustav), *Statistisk tidskrift*, 1908.

Tableau II. — **Décès par la variole de 1776 à 1875.** — A. 1776 à 1810.

AGE	1776 à 178	1781 à 1785	1786 à 1790	1791 à 1795	1796 à 1800	1801 à 1805	1806 à 1810
0 à 1 an.	7.829	5.977	6.160	5.360	6.548	3.323	2.390
1 à 3 ans.	8.854	7.816	6.529	5.752	7.696	3.931	2.788
3 à 5 —	6 250	6.091	3.921	3.255	4 634	2.256	1.566
0 à 5 ans.	22.933	19.884	16.610	14.367	18.878	9.510	6.744
5 à 10 —	4.096	3.733	2.808	2.673	3.341	1.591	1.383
10 à 15 —	944	1.124	656	544	734		
15 à 20 —	352	426	288	177	243	458	461
20 à 25 —	139	177	123	55	95		
25 à 30 —	36	44	37	20	40		
30 à 35 —	17	9	18	5	23		
35 à 40 —	5	5	9		14	27	36
40 à 45 —	3	3	1	»	7		
45 à 50 —	1	1	2	»	»		
50 à 55 —	»	1	»	1	2		
55 à 60 —	»	»	2	»	6	8	29
60	3	8	5	2	6		
	28.529	25.415	20.559	17.847	23.392	11.594	8.653

B. — 1811 à 1845.

AGE	1811 à 1815	1816 à 1820	1821 à 1825	1826 à 1830	1831 à 1835	1836 à 1840	1841 à 1845
0 à 1 an.	761	468	698	694	1.634	1.817	112
1 à 3 ans.	676	366	355	319	659	736	45
3 à 5 —	376	189	148	104	248	333	13
0 à 5 ans.	1.813	1.023	1.201	1.117	2.541	2.886	170
5 à 10 —	375	241	142	96	231	402	15
10 à 15 —							
15 à 20 —	216	248	406	248	431	620	44
20 à 25 —							
25 à 30 —							
30 à 35 —							
35 à 40 —	20	26	197	168	642	950	55
40 à 45 —							
45 à 50 —							
50 à 55 —							
55 à 60 —	5	3	2	10	28	30	32
60							
	2.429	1.541	1.948	1.639	3.873	4.888	316

C. — 1846 à 1875.

AGE	1846 à 1850	1851 à 1855	1856 à 1860	1861 à 1865	1866 à 1870	1871 à 1875
0 à 1 an.	537	1.676	1.346	971	2.401	1.911
1 à 3 ans.	216	491	358	289	704	696
3 à 5 —	97	173	144	94	201	293
0 à 5 ans.	850	2.340	1.848	1.354	3.306	2.900
5 à 10 —	145	223	152	97	203	369
10 à 15 —				59	74	174
15 à 20 —	290	703	541	65	145	276
20 à 25 —				149	258	530
25 à 30 —				180	291	503
30 à 35 —				192	351	634
35 à 40 —	467	1.139	1.292	195	308	627
40 à 45 —				143	313	517
45 à 50 —				102	218	459
50 à 55 —				77	184	322
55 à 60 —	51	141	246	60	136	236
60				52	158	332
	1.803	4.546	4.079	2.725	5.945	7.879

L'épidémie de 1800 ne provoqua qu'une élévation temporaire de la courbe descendante des décès par variole. Si on les avait répartis sur des périodes décennales, l'épidémie n'aurait marqué aucun changement sur la courbe et les chiffres auraient indiqué un abaissement continu (voir le tableau III).

Un simple examen démontre que le nombre des vaccinés de cette période était, par rapport à la population, en trop faible proportion pour expliquer la décroissance produite, et que la vaccination y était pour très peu de chose. Dans cette période le nombre des vaccinés fut de 47.258. On ne se trompera guère en disant que la plus grande partie d'entre eux était représentée par les enfants n'ayant pas encore atteint cinq ans.

Déduction faite de ce nombre à la population moyenne (au-dessous de cinq ans), il reste les habitants sur lesquels la vaccination n'avait eu aucune prise. En supposant que tous les décès aient eu lieu parmi les non-vaccinés, il est facile de calculer com-

bien il y avait de décès par variole sur 100.000 habitants de cette catégorie. Ce calcul donne 755,2, chiffre encore plus bas que le plus petit nombre précédent, soit 1001,9 dans la période 1791-1795. Cela prouve que les décès par variole auraient diminué même sans la vaccination. Bien entendu, on peut faire une semblable évaluation pour les périodes suivantes. Le nombre des vaccinés fut, dans la période 1806-1810, 93.595, soit 25 p. 100 des nouveau-nés ; 1811-1815, 175.632, soit 44 p. 100; 1816-1820, 289.797, soit 72 p. 100. Ces vaccinés déduits de la population, les décès par variole sur 100.000 habitants dans le groupe de zéro à cinq ans se présentent de la manière suivante :

1776-80 : 1696,2; 1781-85 : 1440,7; 1786-90 : 1227,2; 1791-95 : 1001,9; 1796-00 : 1257,3; 1801-05 : 755,2; 1806-10 : 677,2; 1811-15 : 307,6; 1816-20 : 603,1; 1821-25 : 1174,8.

Cependant, cette évaluation parle en faveur de la vaccination. Un certain nombre des vaccinés moururent au cours de cette même période et furent par là déjà éliminés de la population moyenne. Peut-être vaccinait-on, au commencement, des enfants au-dessus de cinq ans. Ce qui est certain toutefois, c'est qu'il y avait quelques décès parmi les vaccinés.

Il résulte néanmoins de ce calcul que la mortalité par variole baissa continuellement jusqu'en 1816-1820. Par la suite, les chiffres indiquent un accroissement de cette mortalité. Certes on pourrait dire qu'on arrivait à un si bon résultat parce que la propagation de la variole, de ses foyers, pouvait être enrayée par la vaccination autour de ceux-ci. Or, on sait que la vaccination fut pratiquée, au commencement, surtout sur les enfants des classes aisées, soit à des individus peu exposés à la maladie. Du reste, si une vaccination de 44 p. 100 des naissances dans la période 1811-1815 avait élevé un tel obstacle à la propagation de la variole qu'il y avait seulement 123,5 décès sur 100.000 habitants dans le groupe de 0 à cinq ans, il serait incompréhensible que la vaccination de 71,5 p. 100 dans la période 1831-35, de 75 p. 100 depuis 1836-40, et de 74 p. 100 depuis 1866-70, ne pût réduire la mortalité dans le même groupe à moins de 130,0 ; 147,5 et 124,2 sur 100.000 habitants.

Il y a encore une raison qui indique que la mortalité était

en baisse à la fin du XVIIIe siècle, baisse qui continuait quelque temps après que fut établie la vaccination. En comparant la relation entre la mortalité du groupe de un an à celle de un à trois ans, on voit que le nombre des décès était presque le même, quoique un peu prédominant dans le dernier jusqu'à la période 1811-1815. A partir de cette époque les décès du premier groupe vont en augmentant (Voir les tableaux II et III). Un examen des décès sur 100.000 habitants (voir le tableau IV) donne le même résultat. Il est évident que c'est la vaccination qui a réduit la mortalité dans le deuxième groupe. Souvent la vaccination ne fut pas pratiquée chez les enfants au-dessous d'un an. Néanmoins la mortalité par variole baissait sans interruption dans ce groupe à partir de 1776 jusqu'à 1821, c'est-à-dire dans une période de quarante-cinq ans environ.

Nous ne connaissons pas la cause de cette diminution. Peut-être la variolisation y était-elle pour quelque chose. Cela n'est pourtant admissible que pour le XVIIIe siècle, car on doit supposer que la vaccination la supprima tout de suite. D'ailleurs la variolisation n'était pas d'un usage assez fréquent pour qu'on puisse la considérer comme une cause suffisante de cette diminution.

TABLEAU III. — **Décès par variole de 1776 à 1875 en périodes décennales.**

AGE	1776 à 1785	1786 à 1795	1796 à 1805	1806 à 1815	1816 à 1825	1826 à 1835	1836 à 1845	1846 à 1855	1856 à 1865	1865 à 1875
0 à 1	13 806	11.520	9.871	3.151	1.166	2.328	1.929	2.213	2.317	4.312
1 à 3	16.670	12.281	11.627	3.464	721	978	781	707	647	1.400
3 à 5	12.341	7.176	6.890	1.942	337	352	346	270	238	494
5 à 10	7.829	5.481	4.932	1.758	383	327	417	368	249	572
10 à 25	3.162	1.843	1.530	677	654	679	664	993	814	1.457
25 à 50	124	95	114	56	223	810	1.005	1.606	2.104	4.221
50	12	10	22	34	5	38	62	192	435	1.368
	53.944	38.406	34.986	11.082	3.489	5.512	5.204	6.349	6.804	13.824

Cependant, ce n'est pas dans toutes les catégories quinquennales que se présente cette diminution de la mortalité par variole. Avant la vaccination, les décès devinrent de plus en

plus rares dans les catégories d'âge avancé. Après la vaccination, un accroissement se fait bientôt remarquer, accroissement qui, dans les dernières périodes décennales, atteint un chiffre très élevé.

Un regard sur les nombres absolus des décès de variole, suffit pour montrer que ceux-ci se répartissent tout autrement dans certains groupes d'âge, après la vaccination qu'avant celle-ci. D'abord laissons de côté l'accroissement de la population et n'examinons que le pourcentage des décès sur la mortalité totale par variole dans les différentes périodes décennales.

Dans le premier groupe, celui de zéro à un an, le nombre absolu des décès a subi une forte diminution, fait qui est tout naturel vu que, en général, la mortalité par variole a considérablement baissé (tableau III). Mais le pourcentage de tous les décès par variole (voir le tableau V) est, dans les dernières périodes, le même ou même plus grand que dans les premières, c'est-à-dire avant la vaccination. Dans les autres groupes, au-dessous de dix ans, la mortalité relative a diminué d'une manière plus ou moins manifeste. Le deuxième groupe, celui de un à trois ans, présentait, avant la vaccination, la plus grande mortalité absolue et relative. Après la vaccination, une diminution commence et va en grandissant pour chaque nouvelle période décennale. La différence s'élève à 20 p. 100, soit de 30 p. 100 dans la période 1776-1785 jusqu'à 9,5 p. 100 dans la période 1856-1865 et à 10,1 p. 100 dans celle de 1866-1875. La diminution est la plus grande chez les enfants âgés de quatre et cinq ans ; à savoir : de 22 p. 100 dans la période 1776-1785, à 3,5 p. 100 dans les deux périodes 1856-1865 et 1866-1875. A partir de 1826 et surtout dans les deux périodes ci-dessus, la mortalité est la plus faible dans le groupe de 3 à 5 ans (en mettant de côté les individus au-dessus de cinquante ans). Dans le groupe de la sixième à la dixième année, la diminution, tout en n'étant pas aussi forte, est quand même très prononcée. De semblables oscillations étant inconnues dans les ravages causés par les maladies contagieuses en général, aussi bien que par la variole en particulier, avant la vaccination, il faut en chercher la cause dans le changement qu'a subi le corps humain par la vaccination.

Tableau IV. — **Mortalité par la variole par an et sur 100.000 habitants.**

AGE	1776 à 1780	1781 à 1785	1786 à 790	1791 à 1795	1796 à 1800	1801 à 1805	1806 à 1810
0 à 1 an.	2517,1	2011,2	2075,8	1687,8	2049,8	1074,8	763,9
1 à 3 ans.	1628,7	1426,9	1207,8	1000,2	1277,0	664,8	476,4
3 à 5 —	1256,7	1139,4	759,8	600,1	799,8	211,0	276,6
0 à 5 ans.	1696,2	1440,7	1227,2	1001,9	1257,3	635,9	460,7
5 à 10 —	428,7	371,0	266,2	245,8	282,9	129,7	112,3
10 à 15 —	93,5	113,2	64,4	50,6	65,9		
15 à 20 —	37,3	44,8	31,0	18,4	23,9	14,2	13,9
20 à 25 —	14,8	18,4	13,0	6,0	9,9		
25 à 30 —	4,2	5,0	4,2	2,2	4,6		
30 à 35 —	2,2	1,0	2,1	0,6	2,7		
35 à 40 —	0,6	0,6	1,2	0,4	1,7	0,7	0,9
40 à 45 —	0,4	0,4	0,1	»	0,9		
45 à 50 —	0,18	0,18	0,36	»	0,4		
50 à 55 —	»	0,19	»	0,19	0,3		
55 à 60 —	»	»	0,4	»	1,4	0,4	1,3
60	0,3	0,9	0,5	0,2	0,5		
	274,8	237,4	190,2	160,4	200,8	97,3	71,7

AGE	1811 à 1815	1816 à 1820	1821 à 18 5	1826 à 1830	1831 à 1835	1836 à 1840	1841 à 1845
0 à 1 an.	217,6	127,8	170,0	168,0	399,6	439,4	25,4
1 à 3 ans.	117,4	56,2	48,2	40,9	84,8	93,7	5,5
3 à 5 —	69,2	31,2	21,6	13,2	32,8	43,9	1,7
0 à 5 ans.	123,5	63,2	65,7	57,1	130,7	147,5	8,4
5 à 10 —	31,7	19,4	10,2	6,0	13,7	23,6	0,8
10 à 15 —							
15 à 20 —	6,1	7,2	11,5	6,6	10,5	13,7	0,9
20 à 25 —							
25 à 30 —							
30 à 35 —							
35 à 40 —	0,5	0,6	1,5	3,6	13,8	19,7	1,1
40 à 45 —							
45 à 50 —							
50 à 55 —							
55 à 60 —	0,2	0,1	0,1	0,4	1,1	1,2	1,2
60							
	20,1	12,2	11,6	11,5	26,3	31,7	1,9

TABLEAU IV (*suite*).

AGE	1846 à 1850	1851 à 1855	1856 à 1860	1861 à 1865	1866 à 1870	1871 à 1875	
0 à 1 an.	117,7	335.4	243.2	163,1	431.1	327.8	
1 à 3 ans.	25.1	53.6	36.3	26,7	66.3	66,9	
3 à 5 —	11.8	20.5	16.0	9,4	19.4	30.8	
0 à 5 ans.	39.8	103.5	55,8	50.6	124.2	112.7	
5 à 10 —	8.1	11.9	7.7	4,5	8,5	15,4	
10 à 15 —				3,0	2.8	7,6	
15 à 20 —	5.9	14.0	10.6	3,6	7.6	13,8	
20 à 25 —				9.0	15,4	31,0	
25 à 30 —				11,6	19.0	33,6	
30 à 35 —				13.4	24.2	45,4	
35 à 40 —	8.6	19.7	20.9	14,0	22,8	46,6	
40 à 45 —				11,4	23,8	41,4	
45 à 50 —				9,8	18.8	37,8	
50 à 55 —				9.2	19.4	30,2	
55 à 60 —	1.8	4,9	8.4	8.8	18,4	27,8	
60 ans.				3,1	9.2	18,4	
	10.6	25.5	21.9	13,6	28,5	36,9	

Voilà une preuve irréfutable de l'effet exercé par la vaccination. Comme celle-ci ne se pratique souvent qu'à la fin de la deuxième année, ou même plus tard, on ne peut s'attendre à une amélioration prononcée dans le groupe de un à trois ans, mais seulement dans celui de trois à cinq ans.

Dans l'âge de dix à vingt-cinq ans, le nombre des décès diminue au début d'une manière considérable, devient ensuite presque constant, pour subir enfin une petite augmentation. Les décès p. 100 de la mortalité totale dans ce groupe d'âge sont, dans les trois dernières périodes décennales, deux fois plus nombreux que dans les trois premières.

Le plus grand accroissement des décès par variole se présente dans le groupe d'âge de vingt-cinq à cinquante ans. La mortalité par variole dans les périodes 1856-1865 et 1866-1875 y est presque aussi grande que dans le groupe de un an. Le pourcentage de tous les décès par variole s'est élevé dans ce groupe de 0,2 p. 100 dans la période 1776-1795 jusqu'à 30,9 p. 100 et à 30.5 p. 100 dans les périodes 1856-1865 et 1866-1875. Presque

le tiers de tous les décès par variole se rencontrent donc dans cette période, parmi les individus qui sont dans l'âge le plus actif de la vie. Il en est de même du groupe au-dessus de cinquante ans. Le coefficient mortuaire s'est élevé de 0,02 p. 100 jusqu'à 6,4 p. 100 pendant ledit intervalle. Voilà un effet produit par la vaccination, lequel n'est point satisfaisant.

TABLEAU V. — **Pourcentage des décès sur la mortalité totale par variole dans les groupes d'âge suivants :**

AGE	1776 à 1785	1786 à 1795	1796 à 1805	1806 à 1815	1816 à 1825	1826 à 1835	1836 à 1845	1846 à 1855	1856 à 1865	1866 à 1875
0 à 1	25,4	30,0	28,2	28,4	33,4	42,2	37,0	34,8	34,0	31,2
1 à 3	30,9	31,7	33,2	31,2	20,7	17,7	15,0	11,1	9,5	10,1
3 à 5	22,9	18,7	19,7	17,5	9,7	6,4	6,6	4,2	3,5	3,5
5 à 10	11,5	14,2	14,1	15,8	10,9	5,9	8,0	5,8	3,6	4,1
10 à 25	5,8	4,7	4,4	6,1	18,8	12,3	12,7	15,6	12,0	10,5
25 à 50	0,2	0,2	0,3	0,5	6,3	14,7	19,3	25,3	30,9	30,5
50	0,02	0,02	0,06	0,3	0,1	0,7	1,2	3,0	6,4	9,9

La mortalité dans le groupe de 25 à 50 ans a, bien entendu, une beaucoup plus grande importance au point de vue économique que celle de la première et de la deuxième années. *A priori*, il est évident qu'une vie de 20 ans représente une plus haute valeur qu'une vie de 1 ou de 2 ans. Les décès survenus dans le groupe 25-50 ans constituent donc une sérieuse perte sociale. On savait depuis longtemps par les statistiques des hôpitaux et par les comptes rendus des épidémies confinées dans certaines régions limitées que, parmi les vaccinés atteints par la variole, le nombre des décès était plus grand sur les âgés que sur les jeunes. En Suède, M. Almquist (1) a attiré l'attention sur ce fait pour la ville de Gothembourg. Il est évident que la connaissance du risque que court l'âge mûr en cas d'épidémie de variole est de la plus grande importance.

La variole protège contre une nouvelle infection de cette maladie. Il est rare qu'une personne en soit atteinte deux fois, et il est encore plus rare que la seconde fois la maladie amène

(1) ALMQUIST (E.), *Sv. Läkaresällskapets förhandlingar*, 1908, p. 231.

une issue fatale. Quant à l'issue mortelle, on peut donc dire que la variole donne une immunité presque parfaite contre elle-même. Plus l'âge avance, moins sont nombreuses les personnes susceptibles de contracter une variole mortelle. Aussi la mortalité par la variole baissait-elle à mesure que l'on avançait en âge avant la vaccination, parce que les personnes ayant eu la variole devenaient de plus en plus nombreuses. Dans les tranches d'âge au-dessus de vingt ans la mortalité était souvent presque nulle. Il en a été tout autrement après la vaccination.

Examinons maintenant quel changement doit produire une immunisation, telle que la vaccination, sur la mortalité par variole. Aujourd'hui on est d'accord que cette immunisation n'a qu'un effet restreint. Cependant, elle s'étend sur des périodes de durée très différente chez différents individus. La vaccination étant en général pratiquée dans la deuxième année, l'immunité acquise doit être la plus parfaite et les décès le moins nombreux peu après cette époque. Plus le temps écoulé après la vaccination est long, plus deviendra grand le nombre de ceux qui sont susceptibles de contracter à nouveau la variole, et en conséquence plus nombreux les décès. C'est précisément ce que montrent les tableaux. Ils prouvent que l'immunité s'affaiblit considérablement après quelque temps. Pour être à même d'apprécier la portée de cet affaiblissement, il faut connaître le nombre des décès proportionnel à la population dans les différentes tranches d'âge.

Il ressort de ce qui précède que la méthode de vaccination employée chez nous jusqu'ici ne donne pas une protection suffisante contre la variole. On peut même se demander si elle donne des résultats réels. Il faudra donc améliorer cette immunité, si l'on veut combattre la variole par l'immunisation. Cette amélioration se fait par la revaccination. La question est de savoir à quel âge cette revaccination doit avoir lieu. Il est clair qu'il n'y a aucune raison d'avoir recours à cette mesure à l'âge où les tableaux ne marquent aucun accroissement de la variole. Mais elle est justifiée à l'âge où se produit cette augmentation. Examinons donc nos matériaux. On ne peut se servir des registres qu'après 1859, les précédents ne contenant que deux des groupes au-dessus de 5 ans, qui nous intéressent ici,

ceux de 5 à 10 et de 10 à 25 ans (le dernier — celui où l'affaiblissement de l'immunité acquise par la vaccination commence à se manifester par l'augmentation des décès par variole — étant trop grand pour donner un résultat applicable dans la pratique). A partir de 1860 les registres peuvent donner à ce sujet des informations d'une grande valeur. A cette époque, la vaccination obligatoire était déjà parfaitement appliquée. Le tableau IV indique les décès par variole dans les divers groupes et sur 100.000 habitants. La mortalité est la plus faible dans le groupe de 11 à 15 ans. Dans le groupe suivant, elle est un peu accrue, mais l'augmentation n'est prononcée que dans le groupe 21-25 ans. L'accroissement des décès est le plus grand dans le groupe 36-40 ans pour baisser de nouveau plus tard. En général on peut dire que l'immunité acquise à l'aide de la vaccination a duré quinze à vingt ans environ. Chez certains sujets, cela va sans dire, elle a eu une durée plus longue.

Ce résultat est en parfaite conformité avec les observations et les calculs faits par F. Rosander (1) et se rapportant à une épidémie de cent cas dans un cercle limité de la province du Geslvikland, en 1893 et 1894. Il constata qu'il n'y avait pas de cas graves chez ceux qui se trouvaient dans les dix premières années après leur vaccination. De ceux qui étaient dans la période de 10 à 20 ans après leur vaccination, 17 p. 100 étaient atteints de variole grave et dans le groupe de ceux qui n'avaient été vaccinés que depuis 20 à 30 ans le nombre en montait à 43 p. 100. Rosander fixe l'époque de la revaccination à la vingtième année. La coutume de revacciner les conscrits est très bonne dans la pratique. Mais il faut veiller à ce que la première vaccination soit exécutée minutieusement, pour que l'immunité dure jusqu'à l'âge de vingt ans. Sans cela, cet usage n'est pas justifié au point de vue scientifique. Il est du reste tout naturel qu'on ne veuille procéder à la revaccination qu'une fois. Voilà encore une raison pour laquelle on doit désirer que l'immunité acquise dure autant que possible.

La baisse de la mortalité par la variole au-dessus de 40-50 ans n'a, bien entendu, aucun rapport avec la vaccination.

(1) Rosander (F.), *Hygiea*, 1895.

Elle exprime une résistance plus grande contre la variole, qui vient avec l'âge.

Tableau VI. — **Répartition des décès par sexes.**

AGE	1776-1800				1860-1875			
	HOMMES		FEMMES		HOMMES		FEMMES	
	Décès.	Population moyenne.	Décès.	Population moyenne.	Décès.	Population moy. (1).	Décès.	Population moyenne.
0 à 1	16.181	31.098	15.693	30.582	2.886	58.727	2.674	56.957
1 à 3	17.863	55.936	18.784	56.448	896	107.360	844	105.171
3 à 5	11.880	53.077	12.271	53.688	320	100.456	286	98.622
5 à 10	8.410	106.002	8.241	105.210	370	232.448	315	230.088
10 à 15	2.014	104.045	1.988	103.824	165	210.572	150	209.390
15 à 20	731	94.236	755	97.305	236	188.273	266	188.059
20 à 25	295	89.417	294	98.114	557	165.142	427	169.553
25 à 30	92	82.310	85	91.203	623	147.452	418	156.831
30 à 35	36	77.893	36	84.633	734	136.987	505	147.599
35 à 40	21	69.549	15	75.476	730	131.411	442	141.288
40 à 45	8	64.465	6	69.435	629	122.030	382	131.602
45 à 50	3	54.189	4	60.284	507	107.998	297	118.542
50 à 55	3	48.131	1	54.620	360	88.264	245	99.970
55 à 60	3	39.065	5	46.102	261	69.090	183	81.788
60	12	81.339	12	106.316	299	146.037	253	196.655
	57.532	1.050.752	58.190	1.132.937	9.570	2.011.647	7.687	2.132.115

(1) La population moyenne se rapporte à la période 1861 à 1875.

Il est curieux de signaler la relation existant entre les décès des deux sexes après la vacination, phénomène démontré par le tableau VI. Avant la vaccination, autant d'hommes que de femmes mouraient de variole. Après la vaccination cet état de choses s'est modifié en faveur des femmes. C'est surtout au-dessus de vingt ans que cette plus grande mortalité des hommes se fait remarquer. Pour 100 décès de femmes on peut constater 150 décès d'hommes. Il est évident que ce fait est d'autant plus à regretter que les hommes étaient déjà auparavant en minorité. Il est très difficile de trouver la cause de ce fait. Il n'est pourtant pas probable que la vaccination ait directement agi

en ce sens. Je suppose que les hommes menant une vie en contact avec d'autres personnes prenaient la variole plus facilement que les femmes, ce qui explique que le nombre des décès d'hommes était supérieur à celui des décès de femmes, les femmes étant retenues à la maison par leurs occupations domestiques.

Conclusions.

En Suède, la mortalité par variole était en décroissance manifeste même avant l'époque où fut introduite la vaccination. Dans les premiers temps après son introduction, la vaccination fut encore d'une pratique trop peu fréquente, pour que l'on soit autorisé à attribuer à son influence seule la diminution considérable qui se manifestait dans la mortalité par variole.

Dans les tranches d'âges les plus basses (au-dessus de 1 an), par contre, l'effet exercé par la vaccination sur la baisse de la mortalité par variole est prouvé à l'évidence.

Un autre résultat, celui-ci peu avantageux, qu'amenait incontestablement la vaccination, est l'accroissement de la mortalité par variole dans les groupes d'âges au-dessus de 20 ans.

La vaccination préserve de variole mortelle pendant une période de 15 à 20 ans.

Après l'introduction de la vaccination, la répartition des décès par variole sur les deux sexes fut autre qu'avant parmi les adultes, le nombre des hommes succombant à cette maladie est devenu plus grand que le nombre correspondant chez les femmes.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1911

par Jules VIALA, Préparateur au service antirabique.

Pendant l'année 1911, 342 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur; aucune mort n'a été signalée.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	342
Mort	0
Mortalité	0

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES TRAITÉES	MORTS	MORTALITÉ
1886	2.671	25	0,94 p. 100
1887	2.770	14	0,79 —
1888	1.622	9	0,55 —
1889	1.830	7	0,38 —
1890	1.540	5	0,32 —
1891	1.559	4	0,25 —
1892	1.790	4	0,22 —
1893	1.648	6	0,36 —
1894	1.387	7	0,50 —
1895	1.520	5	0,38 —
1896	1.308	4	0,30 —
1897	1.521	6	0,39 —
1898	1.465	3	0,20 —
1899	1.614	4	0,25 —
1900	1.420	4	0,28 —
1901	1.321	5	0,38 —
1902	1.005	2	0,18 —
1903	628	2	0,32 —
1904	755	3	0,39 —
1905	721	3	0,41 —
1906	772	1	0,13 —
1907	786	3	0,38 —
1908	524	1	0,19 —
1909	467	1	0,21 —
1910	401	0	0,0 —
1911	342	0	0,0 —

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

* * *

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1911.

ANNÉE 1911	MORSURES à la tête.			MORSURES aux mains.			MORSURES aux membres.			TOTAUX		
	Traités.	Mort.	Mortalité.	Traités.	Mort.	Mortalité.	Traités.	Mort.	Mortalité.	Traités.	Mort.	Mortalité.
Tableau A. . . .	21	0	0	36	0	0	19	0	0	76	0	0
Tableau B. . . .	8	0	0	82	0	0	24	0	0	114	0	0
Tableau C. . . .	8	0	0	63	0	0	81	0	0	152	0	0
	37	0	0	181	0	0	124	0	0	342	0	0

Au point de vue de leur nationalité, les personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre 3
Lorraine 4
Indes-Anglaises. 2
Russie 4
États-Unis 1
Luxembourg 1

Répartition par départements des 330 Français traités.

Allier	5	Maine-et-Loire	3
Alpes-Maritimes	2	Morbihan	2
Aveyron	2	Meurthe-et-Moselle	8
Cantal	13	Nièvre	5
Charente	5	Oise	9
Calvados	6	Puy-de-Dôme	16
Corrèze	4	Pyrénées (Basses-)	4
Creuse	8	Pyrénées (Hautes-)	5
Eure-et-Loir	5	Sarthe	4
Finistère	5	Sèvres (Deux-)	4
Garonne (Haute-)	4	Seine-Inférieure	12
Ille-et-Vilaine	9	Seine-et-Marne	3
Indre	5	Seine-et-Oise	15
Indre-et-Loire	4	Seine	105
Loire-Inférieure	6	Somme	17
Loiret	3	Vienne	8
Lot	14	Vosges	5
Manche	2	Yonne	2

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.

26e ANNÉE SEPTEMBRE 1912 N° 9

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA COAGULATION DU SANG ET LA GENÈSE DE LA THROMBINE

par les Drs J. BORDET et L. DELANGE

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

Nous comptons exposer dans ce mémoire, d'une manière suffisamment explicite, les recherches que nous poursuivons depuis assez longtemps sur la coagulation du sang ; nous avons à vrai dire signalé déjà, dans de brèves notes préliminaires (1), certains faits que nous avons observés, notamment la production de fibrin-ferment aux dépens des plaquettes, le mode de réaction entre celles-ci et le sérum, le pouvoir de la peptone de mettre en liberté du fibrin-ferment dans certaines conditions ; mais ces communications sommaires étaient sobres de détails expérimentaux, elles passaient sous silence divers faits dont la connaissance n'est sans doute point dénuée d'intérêt ; aussi, tout en attirant aujourd'hui l'attention sur quelques notions nouvelles, avons-nous jugé nécessaire de revenir, en les précisant, sur les données que nous avons antérieurement mentionnées. Nous croyons devoir fournir tout d'abord quelques indications concernant la technique que nous avons suivie et les motifs qui nous l'ont fait adopter.

Pour mettre en évidence, dans un liquide soumis à l'étude,

(1) *Bulletin de l'Académie royale de Belgique*, juin 1911; *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, mars 1912, t. LXXII, p. 510.

le principe actif qui provoque la coagulation et qu'on appelle communément fibrin-ferment ou thrombine, nous avons très fréquemment employé le plasma oxalaté, que nous préférons de beaucoup à la solution dite pure de fibrinogène. On le sait, le fibrinogène, élément passif, se solidifie sous l'influence de la thrombine, laquelle n'existe dans le sang circulant qu'à l'état de substances-mères par elles-mêmes inactives, et ne se forme aux dépens de ces matières que si le sang extrait du corps est soumis, en présence de sels calciques, au contact d'un corps étranger. Les sels de chaux, indispensables à la production de la thrombine (Arthus et Pagès), ne sont plus nécessaires à la coagulation dès que la thrombine a pu prendre naissance (Pekelharing, Hammarsten) : un liquide calcifié où de la thrombine s'est formée peut, après addition d'un excès d'oxalate ou autre décalcifiant, solidifier le fibrinogène. A condition bien entendu d'avoir été préparé avec le soin voulu, le plasma oxalaté ne contient, outre le fibrinogène, que des matières indifférentes ou des substances-mères condamnées à l'inertie aussi longtemps que la recalcification n'est pas opérée. Si donc on l'additionne d'un liquide contenant de la thrombine, en prenant soin naturellement de maintenir un excès d'oxalate, la coagulation qui survient ne peut être attribuée qu'à cette thrombine préformée, puisque aucune dose additionnelle du même principe ne saurait être engendrée dans le mélange. Quant à la solution dite de fibrinogène pur, et qu'il serait plus conforme aux faits d'appeler simplement solution de fibrinogène obtenue par précipitations successives sous l'influence du sel, elle n'offre pas nécessairement la même garantie. C'est parce qu'elle inspire une fausse sécurité que l'on croit souvent pouvoir, en vue de déceler la thrombine d'un liquide, la mélanger à celui-ci en milieu calcifié. Une méthode de séparation fondée sur le pouvoir insolubilisant du sel concentré n'est pas très délicate ; il serait étonnant que le fibrinogène ainsi obtenu n'eût pas entraîné avec lui certaines matières capables, en présence de chaux, d'intervenir dans la coagulation, d'autant plus que de telles matières témoignent d'une réelle aptitude à s'accoler aux précipités. On exige à vrai dire, comme preuve de la pureté de cette solution, qu'elle ne soit point susceptible de se coaguler spontanément en milieu calcifié. D'abord, on n'obtient pas toujours un produit répondant

entièrement à cette condition. Ensuite, même s'il satisfait à cette exigence, il ne doit pas néanmoins être considéré comme sûrement exempt de proferment. Il est bien vraisemblable, on le sait, que le proferment n'est pas constitué par une substance unique, et qu'outre le calcium, deux matières, peut-être davantage, participent à la formation de la thrombine. Un fibrinogène souillé de l'une seulement d'entre elles pourrait donc rester fluide, même en présence de chaux. Mais en milieu calcifié on ne pourrait s'en servir en vue de rechercher si un liquide donné contient réellement de la thrombine. Car, mélangé à un semblable liquide, il serait capable d'y déceler, non pas exclusivement une thrombine préformée, mais aussi la seconde matière génératrice dont il est lui-même dépourvu ; en effet, s'il rencontrait celle-ci, il en révélerait la présence en se coagulant sous l'influence d'une thrombine à la production de laquelle il aurait lui-même contribué. Il est donc beaucoup plus prudent, pour déceler uniquement une thrombine déjà toute formée, d'opérer en milieu décalcifié. Tout en satisfaisant à cette condition, le plasma oxalaté, d'autre part, se rapproche autant qu'il est possible, par sa composition, du liquide sanguin normal.

Nous n'insistons guère sur les précautions dont la préparation du plasma oxalaté doit être entourée : il faut, lorsqu'on extrait le sang, éviter toute souillure par le suc de tissus. Le tube (1) qui sert à la saignée du lapin (nous avons eu généralement recours à cet animal) doit être enduit intérieurement de paraffine, afin que le sang, avant de rencontrer la solution d'oxalate sodique à 1 p. 100, soit préservé du contact avec le verre. On sait que le contact avec un corps étranger mouillable joue un rôle décisif dans la coagulation. Recueilli au sortir de l'artère, dans un vase enduit de vaseline, le sang ne se coagule que fort lentement (Freund). En se servant de tubes paraffinés,

(1) Nous employons un tube de verre dont la partie inférieure s'effile en bec recourbé que l'on introduit dans l'artère, tandis que l'orifice supérieur est muni d'un tampon d'ouate. Lorsque le sang a atteint la hauteur voulue, on retire le tube, on perd les premières gouttes et, en soufflant à travers le tampon, on dirige le jet dans un tube jaugé, également paraffiné, et qui contient la dose voulue (1 p. 10 du volume total) de solution d'oxalate sodique à 1 p. 100 (cette solution contient aussi 0,5 p. 100 de NaCl) ; on mélange rapidement et on centrifuge en tube de verre ordinaire.

Bordet et Gengou ont obtenu, par centrifugation de sang de lapin, du plasma limpide qui se maintenait longtemps fluide en paraffine, mais se solidifiait rapidement dès qu'on le transvasait dans un récipient en verre ; ils ont montré que le contact avec la paroi, même en l'absence de cellules, hâte considérablement l'apparition de la thrombine. Il est utile de contrôler que le sang extrait ne s'est pas modifié, soit par le contact (1), soit par la pénétration de suc de plaie. Dès qu'on a réparti la majeure partie du sang dans le tube à oxalate, l'excès restant dans le tube à saigner est introduit dans un verre à pied ordinaire (non paraffiné) que l'on garde à l'abri de toute secousse. Un revêtement solide se forme bientôt contre la paroi, mais il ne doit s'épaissir que lentement, la partie centrale du liquide doit se maintenir fluide fort longtemps. Souvent, vers le milieu, le sang est encore fluide après plusieurs heures, tandis que les globules rouges et blancs se déposent ; si l'on en pique la surface avec un tube capillaire, celui-ci se remplit d'un plasma blanchâtre troublé par les plaquettes, que leur faible densité a préservées de la sédimentation. Cette expérience très simple est particulièrement démonstrative au point de vue du rôle du contact avec la paroi.

Obtenu dans ces conditions, le sang de lapin, oxalaté à 1 p. 1000, fournit par centrifugation énergique un plasma stable qui, conservé au frais, reste identique à lui-même pendant les trois ou quatre jours que dure son emploi. S'il y apparaît un léger caillot floconneux, c'est qu'une faute a été commise.

Pour mettre en relief le pouvoir coagulant d'un liquide et servir ainsi de réactif de la thrombine, le plasma oxalaté doit être employé d'une façon qu'il importe de préciser. Il faut évidemment que la réaction s'opère en milieu décalcifié, c'est-à-dire que le calcium soluble apporté par le liquide coagulant soit, comme l'a été celui du plasma, neutralisé par l'oxalate. Or, contrairement à ce que l'on pensait autrefois, il est certain

(1) En général, les paraffines solides du commerce (même mélangées par fusion préalable avec leur volume de paraffine liquide) ne représentent malheureusement pas une paroi tout à fait indifférente pour le sang. Souvent, celui-ci parvient à la mouiller au bout de quelque temps, à la faveur d'une adsorption de matières albuminoïdes, et n'est plus protégé dès lors contre la coagulation par contact. Mais, si l'on opère vite, cet inconvénient n'a pas le temps de se manifester.

que l'activité coagulante d'un liquide contenant de la thrombine, du sérum par exemple, souffre du contact avec l'oxalate. Bordet et Gengou ont apporté à cet égard des renseignements que nous avons pu compléter et sur lesquels il convient de revenir brièvement. Mais nous devons tout d'abord, pour plus de clarté, rappeler les constatations de ces auteurs (1) concernant l'affaiblissement très rapide de la thrombine sous l'influence de la conservation.

Du sang de lapin est, au sortir de l'artère, salé à 5 p. 100 par mélange avec un tiers de solution de NaCl à 20 p. 100 ; la centrifugation fournit un plasma incoagulable : on sait que la forte concentration saline agit comme l'oxalate, c'est-à-dire s'oppose à l'apparition de la thrombine, mais qu'il suffit d'abaisser la teneur saline par addition d'une quantité convenable d'eau distillée (4 volumes) pour permettre aux phénomènes de suivre leurs cours et provoquer ainsi la coagulation. Préparons une telle dilution ; d'autre part, préparons-en une seconde, identique à la première, que nous avons soin d'oxalater à 1 p. 1000 (par addition à 9 volumes de 1 volume d'oxalate sodique à 1 p. 100). Par défibrination la première dilution se convertit bientôt en sérum, dont la thrombine peut être décelée grâce à la seconde dilution. Quelques minutes après que le sérum s'est formé, transportons-en 0,9 cent. cube dans un tube contenant 0,1 cent. cube d'oxalate à 1 p. 100 ; laissons le contact avec l'agent décalcifiant se prolonger pendant cinq minutes, puis ajoutons 1 cent. cube du plasma dilué oxalaté. Le mélange se prend en masse au bout de trois minutes à peine ; le sérum tout récemment obtenu est donc extrêmement actif. Répétons l'expérience un quart d'heure plus tard ; le sérum s'est déjà très nettement affaibli ; il exige une demi-heure pour coaguler le plasma oxalaté. Quant à celui-ci, la conservation ne le modifie guère : il se laisse toujours coaguler rapidement par du sérum frais, lentement par du sérum vieilli, dont il ne décèle donc la thrombine que fort péniblement.

Mais on peut opérer autrement. Au lieu d'ajouter au sérum lui-même la dose requise d'oxalate et d'effectuer quelques minutes plus tard le mélange avec le plasma oxalaté, on peut introduire cette dose dans le plasma oxalaté auquel on ajoute ensuite le sérum ; en d'autres termes, on mélange cette fois, suivant les mêmes proportions que précédemment, du sérum, non décalcifié au préalable, à du plasma doublement oxalaté. Cette variante de technique ne change rien à la constitution du mélange total (dont la teneur en oxalate reste la même), elle a cependant une influence décisive sur le temps d'apparition de la coagulation, surtout lorsqu'il s'agit de sérum un peu vieilli ; la prise en caillot est alors considérablement accélérée. Par exemple, un sérum âgé d'une heure environ, qui, oxalaté à 1 p. 1000, exige une à deux heures pour coaguler volume égal de plasma dilué oxalaté à 1 p. 1000, solidifie en quelques minutes, s'il n'a pas été décalcifié au préalable, volume égal de plasma dilué oxalaté à 2 p. 1000. Quand le sérum est très frais et manifeste corrélativement une énergie extrême, la différence n'est guère perceptible, la coagulation survenant très vite quelle que soit la manière d'opérer.

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904, p. 101. On le sait, Schmidt avait déjà constaté que la thrombine s'affaiblit en vieillissant.

Il semble résulter de ces faits, constatés par Bordet et Gengou (1), que la thrombine un peu âgée est altérée par l'oxalate lorsqu'elle est touchée par celui-ci avant d'avoir rencontré le fibrinogène. On pourrait objecter, à vrai dire, que sans être réellement atteinte par l'oxalate, elle agit plus aisément en présence de traces de sels calciques solubles et que précisément la neutralisation de ceux-ci n'est pas tout à fait instantanée lorsque à du sérum calcifié on mélange volume égal de plasma oxalaté à 2 p. 1000; la présence de Ca soluble, fût-ce pendant de courts instants, suffit peut-être à favoriser beaucoup la coagulation du fibrinogène par la thrombine. Afin de vérifier le bien fondé de cette remarque, nous avons complété l'expérience de coagulation de plasma oxalaté par le sérum, en réalisant la troisième forme dont elle est susceptible. Si l'on peut, au lieu de mélanger du sérum et du plasma séparément oxalatés tout d'abord, ajouter à du sérum non décalcifié du plasma doublement oxalaté, on peut aussi introduire dans du sérum doublement oxalaté du plasma non décalcifié; naturellement, dans ce cas, celui-ci doit être préparé immédiatement avant l'expérience afin de n'avoir pas eu le temps de se modifier spontanément. Suivant cette troisième façon d'opérer, comme suivant la seconde, au moment où la thrombine rencontre le fibrinogène, un peu de sel calcique persiste dans le mélange pendant les courts instants nécessaires à la précipitation complète par l'oxalate. Signalons ce détail qu'au lieu de diluer le plasma salé par de l'eau distillée pure, ce qui abaisse trop au-dessous de la normale la concentration en sels calciques, nous l'avons allongé d'eau distillée contenant une trace de $CaCl^2$ (0,015 p. 100), ce qui hâte nettement la coagulation (2).

Exp. I. — Par dilution de plasma salé à 5 p. 100, avec 4 volumes d'eau distillée légèrement calcifiée, on obtient après coagulation et défibrination un sérum qu'on laisse vieillir une heure. Une autre portion de plasma salé est diluée de même, immédiatement avant la confection des mélanges indiqués ci-dessous. Tant du sérum que du plasma tout récemment dilué, une

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904, p. 114.

(2) Le plasma salé limpide employé dans cette expérience se coagulait lentement, en 2 heures environ, par dilution avec 4 volumes d'eau distillée; mélangé avec 4 volumes d'eau distillée légèrement calcifiée, il n'exigeait que 45 minutes pour se solidifier. — Bien entendu, la trace de $CaCl^2$ introduite est assez minime pour que le sérum obtenu, oxalaté à 1 p. 1000, contienne un fort excès d'oxalate.

partie est employée telle quelle, une autre est oxalatée à 1 p. 1000, une autre l'est à 2 p. 1000. On introduit dans les tubes :

A. — 1 cent. cube de plasma dilué récent oxalaté à 2 p. 1000, 1 cent. cube de sérum non oxalaté.

B. — 1 cent. cube de plasma dilué récent oxalaté à 1 p. 1000, 1 cent. cube de sérum oxalaté à 1 p. 1000.

C. — 1 cent. cube de plasma dilué récent non oxalaté, 1 cent. cube de sérum oxalaté à 2 p. 1000.

La coagulation s'opère en 7 minutes dans le tube A, en 3 heures dans le tube B, en 2 heures 20 minutes dans le tube C. Elle ne se fait donc rapidement que là où le sérum n'a pas été touché par l'oxalate avant de rencontrer le fibrinogène. Elle est un peu moins lente en C qu'en B (la différence n'est pas très grande), probablement parce que la thrombine atteinte par l'oxalate y est dans une faible mesure régénérée grâce à de faibles traces de chaux provenant du plasma et qui ne sont pas instantanément précipitées par l'oxalate qu'apporte le sérum.

Pour agir énergiquement, il faut que le liquide contenant la thrombine n'ait pas été entièrement privé de son propre sel calcique soluble au moment où il entre en contact avec le fibrinogène.

Ce qui nous importe surtout ici, c'est l'indication technique. Quand on aura besoin d'un réactif sensible de la thrombine, on emploiera le plasma oxalaté à 2 p. 1000, auquel on ajoutera volume égal de sérum non décalcifié. Quand on voudra mettre en relief l'existence dans un liquide d'une thrombine toute fraîche, très énergique, que l'on désire différencier d'une thrombine plus âgée renfermée dans le même liquide, on mélangera ce liquide au plasma après les avoir oxalatés séparément à 1 p. 1000.

Nous aurons rarement recours, dans les expériences qui suivent, au plasma salé. Nous emploierons couramment le plasma de lapin oxalaté à 1 p. 1000, soit contenant encore les plaquettes, soit débarrassé de ces éléments ; nous aurons besoin aussi de suspensions de plaquettes lavées. Pour obtenir celles-ci, il faut s'adresser à la technique classique, qui met à profit la remarquable légèreté des plaquettes et la résistance corrélative, signalée par Mosen en 1893, qu'elles offrent à la centrifugation.

Le sang de lapin qu'on vient d'extraire et d'oxalater à 1 p. 1000 est centrifugé pendant un quart d'heure environ à vitesse modérée, laquelle suffit à réaliser le dépôt des globules rouges et blancs et détermine la séparation d'un plasma très trouble qui a conservé ses plaquettes et qu'on décante. Si l'on tient à obtenir des plaquettes sûrement exemptes de globules rouges et de leucocytes, ce qui est indispensable lorsqu'il s'agit d'établir leur part propre

dans le phénomène de la coagulation, on centrifuge ce plasma à une vitesse plus grande, pendant un temps suffisant mais non exagéré. Une bonne partie des plaquettes se dépose, le plasma surnageant en contient néanmoins encore, tout en s'étant débarrassé totalement des autres éléments cellulaires. Après décantation, une nouvelle centrifugation très énergique et très prolongée de ce plasma fournit un sédiment de plaquettes dont la pureté est contrôlée par l'examen microscopique à l'état frais ou après coloration par le Giemsa. Pour en obtenir une suspension, on délaie le sédiment dans un grand volume de solution physiologique de NaCl (à 0.9 p. 100) oxalatée à 0.5 p. 1000; on centrifuge très énergiquement (environ 3.000 tours) pendant 2 heures à peu près, on décante, on répète le lavage et l'on obtient finalement un dépôt exempt de plasma, que l'on délaie dans un peu de solution physiologique oxalatée.

Suivant l'énergie et la durée de la centrifugation, on obtient un plasma oxalaté qui contient encore des plaquettes, ou bien est très limpide et n'en renferme plus que des traces. A vrai dire, on ne peut garantir que la turbine puisse jamais éliminer entièrement ces éléments ; son action doit être aussi forte et aussi prolongée que possible.

Pour provoquer la coagulation du plasma oxalaté, nous le diluons habituellement avec quatre volumes de solution physiologique calcifiée (que pour abréger nous appellerons EPCa), préparée de telle sorte (1) que ces quatre volumes renferment une fois et demie la quantité de sel calcique nécessaire à la neutralisation d'un volume d'oxalate à 1 p. 1000, le sang dont le plasma dérive ayant été oxalaté à 1 p. 1000. Mieux vaut, en effet, restituer un petit excès de Ca, de telle sorte que malgré la dilution la concentration en cet agent ne descende pas trop bas. On rend ainsi la coagulation plus rapide, on rend négligeables les minimes inégalités que divers échantillons de sang peuvent présenter entre eux quant à leur richesse originelle en sels calciques, et les petites erreurs dans le dosage de l'oxalate dont on les a additionnés. On sait que pour provoquer la coagulation du plasma oxalaté, il n'est nullement nécessaire de lui restituer la totalité de la chaux dont l'oxalate l'avait privé : une trace de calcium soluble suffit. Aussi la proportion de 4 volumes de notre EPCa pour un volume de plasma oxalaté dépasse-t-elle très notablement la dose minima coagulante :

(1) Nous commençons par préparer une solution de $CaCl^2$ précipitant exactement volume égal d'oxalate à 1 p. 100; cette solution-mère contient environ 1 p. 100 de $CaCl^2$. Pour obtenir EPCa, nous mélangeons alors 30 cent. cubes de cette solution à 770 cent. cubes de solution physiologique de NaCl.

pour 1 cent. cube de plasma de lapin, cette dose est environ de 2 cent. cubes et pour 1 cent. cube de plasma de cobaye (également oxalaté à 1 p. 1000) environ de 1 cent. cube 50. Remarquons immédiatement néanmoins que la coagulation d'un mélange de 1 vol. de plasma oxalaté à 1 p. 1000, et de 4 vol. d'EPCa, fournit un sérum qui, oxalaté lui-même à 1 p. 1000, contient désormais un fort excès d'oxalate sodique.

Comme plasma spontanément incoagulable, nous employons très fréquemment une dilution du plasma originel, oxalaté à 1 p. 1000, dans quatre volumes de solution physiologique oxalatée soit à 1 p. 1000 (plasma dilué monoxalaté), soit à 2 p. 1000 (plasma dilué dioxalaté). La dilution est donc au cinquième pour le plasma oxalaté comme pour le sérum.

§ I. — Rôle des plaquettes dans la production de la thrombine pendant la coagulation du sang.

Hayem et Bizzozero, qui ont découvert les plaquettes, leur attribuaient déjà un rôle important dans la coagulation et exprimèrent l'idée qu'elles participaient à la formation de la thrombine. Mosen (1), en 1893, constata que le plasma oxalaté se coagule plus vite par recalcification lorsqu'il est riche en plaquettes que lorsqu'il en est dépourvu. D'après Morawitz (2), les suspensions de plaquettes dans l'eau distillée peuvent provoquer la coagulation de solutions de fibrinogène et joueraient un rôle analogue à celui des globules blancs. Pour Nolf (3), les plaquettes, tout en étant capables de contribuer à la coagulation, ne jouent en somme qu'un rôle banal et assez effacé : si elles n'existaient pas, on ne s'en apercevrait presque pas dans l'observation de la coagulation. Lesourd et Pagniez (4), plus récemment, ont prouvé définitivement que les plaquettes accélèrent la coagulation du plasma oxalaté recalcifié, coagulent le liquide d'hydrocèle, interviennent dans la rétractilité du caillot, tandis que les leucocytes, purgés de plaquettes par centrifugation frac-

(1) *Arch. f. Anat. und physiol. Physiol.* Abt., 1893, p. 352.
(2) *Deutsche Arch. f. klinische Medizin*, 1904, p. 225.
(3) *Archives internationales de Physiologie*, 1908.
(4) *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1909, n° 1.

tionnée, se montrent presque inactifs; les propriétés des plaquettes disparaissent par chauffage à 58 degrés.

Selon quel mécanisme les plaquettes interviennent-elles pour favoriser si nettement la coagulation? Servent-elles de support au fibrinogène dont la condensation à l'état solide s'opère ainsi plus facilement? Ne jouent-elles qu'un rôle thromboplastique banal? Interviennent-elles, au contraire, dans l'élaboration de la thrombine elle-même et, dans ce cas, leur participation est-elle plus importante que celle des autres cellules sanguines? Pour le savoir, nous avons répété les expériences de Lesourd et Pagniez, en ayant soin d'évaluer en outre la teneur en thrombine des sérums issus de la coagulation soit de plasmas riches en plaquettes, soit de plasmas privés de ces éléments. Nous avons constaté ainsi des différences frappantes entre ces deux sortes de sérums: la thrombine est très abondante dans les premiers, les seconds n'en contiennent que des traces.

Exp. II. — Du plasma oxalaté de lapin, modérément centrifugé et contenant donc encore des plaquettes mais privé presque complètement de ses globules rouges et blancs, est divisé en deux parts : l'une est gardée telle quelle, l'autre centrifugée à fond jusqu'à obtention d'un plasma très limpide que l'on décante et qui au microscope se montre purgé de toute cellule. Volumes égaux des deux plasmas sont additionnés de quatre volumes d'eau physiologique calcifiée (EPCa). Le plasma contenant encore ses plaquettes se coagule en 8 minutes 1/2, l'autre en 39 minutes (à la température du laboratoire).

Exp. III. — Le plasma à plaquettes de l'expérience II contenant encore de très rares lymphocytes, on procède cette fois d'une manière plus rigoureuse. Du plasma riche en plaquettes (obtenu par centrifugation modérée) est turbiné à nouveau, à grande vitesse, pendant près d'une heure. On décante le plasma surnageant qui a perdu la grande majorité de ses plaquettes, mais est encore un peu trouble; une nouvelle centrifugation très prolongée fournit un sédiment peu abondant formé de plaquettes et tout à fait exempt d'autres éléments cellulaires.

Un peu de plasma surnageant, très limpide, que l'on a décanté est versé sur le sédiment que l'on y délaie. Volumes égaux de ce plasma à plaquettes et du plasma très limpide décanté sont additionnés de quatre volumes d'EPCa; le premier plasma se coagule en 13, le second en 30 minutes.

Exp. IV. — On répartit dans deux tubes volumes égaux (1 c. c.) d'un même plasma oxalaté très limpide et dépouillé autant que possible de ses plaquettes. On ajoute à l'un des tubes une goutte d'une suspension épaisse de plaquettes bien lavées (ne contenant pas de leucocytes) qui communique au plasma un trouble intense. On introduit ensuite dans les deux tubes quatre volumes d'EPCa. Le plasma enrichi de plaquettes se coagule en 3, l'autre en 30 minutes.

Exp. V. — On déchire les caillots formés dans les plasmas de l'expérience II, de manière à faire sourdre les sérums, que l'on oxalate à 1 p. 1000. Cinq

minutes plus tard, on les mélange à volume égal de plasma dilué oxalaté à 1 p. 1000. Le sérum issu du caillot sans plaquettes ne provoque pas la coagulation même après 24 heures; l'autre provoque la coagulation en moins d'une heure. Le premier est pourtant le plus frais des deux, puisque le caillot dont il est issu s'est formé après celui du plasma à plaquettes.

Mais on peut aussi évaluer la teneur en thrombine des deux sérums en les ajoutant, sans les décalcifier, à volume égal de plasma dilué dioxalaté. Dans ces conditions, le premier sérum (du plasma sans plaquettes) ne provoque la coagulation qu'après plusieurs heures, l'autre en 16 minutes.

On peut aussi déterminer la richesse en thrombine en recherchant dans quelle mesure les sérums hâtent la coagulation du plasma très limpide que l'on vient de recalcifier.

Exp. VI. — Livré à lui-même, ce plasma (dilué et recalcifié par quatre volumes d'EPCa) se coagule en 35 minutes. Mais additionné d'un dixième de son volume de sérum (on utilise dans ce but les sérums de l'expérience IV) provenant soit du caillot à plaquettes, soit du caillot sans plaquettes, il se coagule soit en 7, soit en 28 minutes. Le second de ces deux sérums n'accélère donc que très peu la coagulation.

On le voit, les divers procédés destinés à évaluer la teneur en thrombine donnent des résultats concordants et la part des plaquettes dans la production de ce principe apparaît avec beaucoup d'évidence.

Lesourd et Pagniez ont signalé que, contrairement à ce qui se passe pour le plasma oxalaté, le plasma salé que l'on dilue par l'eau distillée se coagule également vite, soit qu'il contienne encore des plaquettes, soit qu'il en ait été dépouillé au préalable par une forte centrifugation. Nous avons observé le même fait et nous croyons pouvoir l'attribuer à ce que la forte concentration saline extrait aisément le principe actif des plaquettes qui diffuse alors dans le liquide ambiant; d'autre part, il est probable qu'en raison de sa densité supérieure, il est plus difficile de purger un plasma salé de ses plaquettes (ou des débris de ses plaquettes) par la centrifugation.

L'expérience montre, en effet, qu'un plasma salé à 5 p. 100, additionné de quatre volumes d'eau distillée (que nous calcifions très légèrement), fournit, conformément aux données de Bordet et Gengou, un sérum remarquablement riche en thrombine, et il importe assez peu, à cet égard, que le plasma salé ait été, au préalable, modérément turbiné, ou soumis à la centrifugation très prolongée usitée pour l'élimination des plaquettes. Mais si l'on sale à 5 p. 100 deux plasmas oxalatés, l'un riche, l'autre très pauvre en plaquettes, si on les recalcifie et les dilue

ensuite par quatre volumes d'eau distillée, les temps de coagulation sont respectivement de 1 h. 1/2 et de 4 h. 1/4.

D'autre part, l'influence extractive exercée par le sel concentré sur les plaquettes peut se démontrer comme suit :

Exp. VII. — Dans deux tubes A et B on verse 3 cent. cubes de plasma oxalaté riche en plaquettes; en A, on ajoute 1 cent. cube de NaCl à 20 p. 100, puis, cinq minutes plus tard, 16 cent. cubes d'eau; en B, on ajoute 17 cent. cubes d'un mélange d'une partie de NaCl à 20 p. 100 avec 16 parties d'eau. Les deux plasmas ont donc désormais la concentration saline; la seule différence, c'est que le plasma du tube A a été exposé à une forte concentration. On centrifuge les deux tubes pour éliminer les plaquettes, et on recalcifie les liquides surnageants décantés. Après coagulation (qui s'opère plus vite en A), on détermine l'énergie coagulante des sérums obtenus; on trouve que le sérum de A est beaucoup plus actif que celui de B, où les plaquettes n'ont été en contact qu'avec du sel dilué.

Il ne faudrait pas conclure de cette expérience que lorsque les conditions de concentration sont normales, les plaquettes ne mettent aucunement en liberté leurs principes actifs dans le liquide ambiant.

Cette diffusion s'accomplit en réalité, mais pas instantanément; les suspensions de plaquettes dans la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000, que l'on conserve quelque temps, un, deux jours par exemple, à la température du laboratoire, fournissent par centrifugation un liquide presque limpide et très actif, qui fonctionne donc comme un extrait de plaquettes.

Un caractère important du principe actif des plaquettes, c'est sa résistance remarquable à la chaleur :

Exp. VIII. — On a préparé une suspension de plaquettes lavées, dans la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000. Une partie est chauffée pendant 15 minutes à 100 degrés.

Dans trois tubes A B C, on laisse tomber : en A, 5 gouttes de plaquettes chauffées à 100 degrés ; en B, même dose de plaquettes non chauffées ; en C, même dose de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000. On ajoute ensuite aux trois tubes 2 cent. cubes d'EPCa et 0,5 cent. cube de plasma oxalaté bien limpide; la coagulation exige en A et B, 10 minutes, en C, 30 minutes.

Des expériences analogues montrent que les plaquettes gardent leur activité après dessiccation.

La thermostabilité de la substance active des plaquettes permet aisément l'obtention de suspensions stérilisées, et, si l'on fait intervenir la centrifugation, d'extraits stériles très actifs. Il suffit de placer les suspensions dans le bain de vapeur à

100 degrés, pendant 6 à 7 minutes, à trois reprises, à quelques jours d'intervalle. La chaleur favorise le floconnement des plaquettes, qui se centrifugent alors aisément. Le liquide surnageant, absolument limpide ou à peine opalescent, se montre très actif et garde longtemps ses propriétés :

Exp. IX. — On introduit dans trois tubes 1 cent. cube de plasma oxalaté bien limpide, puis 4 cent. cubes d'EPCa. On ajoute ensuite dix gouttes, au tube A, d'une émulsion de plaquettes fraîches, au tube B, d'extrait de plaquettes obtenu comme il vient d'être dit et qui a été conservé pendant deux mois, au tube C, de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000.

La coagulation s'opère en A en 15 minutes, en B en 20 minutes, en C en deux heures.

MM. Lesourd et Pagniez ont beaucoup insisté sur le rôle des plaquettes dans la rétractilité du caillot (1). Nous pouvons confirmer entièrement leurs observations, ce rôle est extrêmement manifeste. En l'absence de plaquettes, la rétraction du caillot est pour ainsi dire nulle. Le plasma oxalaté limpide, que l'on additionne de plaquettes, fournit après recalcification un caillot d'autant plus rétracté que la dose des plaquettes ajoutées a été plus copieuse. Si à 1 cent. cube de plasma oxalaté limpide on ajoute quelques gouttes d'une suspension épaisse de plaquettes et 4 cent. cubes d'EPCa, la coagulation se fait en 4 minutes (sans plaquettes le même plasma dilué ne se coagule qu'après une demi-heure), et le caillot décollé du tube se rétracte, en devenant très compact, au point de ne pas dépasser, le lendemain, la dimension d'un grain de blé.

Sont-ce les matériaux insolubles constituant la trame même des plaquettes qui interviennent dans ce phénomène de contraction, ou bien est-ce la substance qui participe à la formation de la thrombine et qui, nous l'avons vu, est susceptible de se diffuser dans le liquide ambiant? Les faits plaident en faveur de la première hypothèse. L'extrait limpide de plaquettes, obtenu par stérilisation et centrifugation, et qui active la coagulation, ne favorise pas la rétraction. Les caillots formés dans les tubes de l'expérience IX ont été décollés peu après leur formation. On trouve, le lendemain, que seul le caillot du tube A s'est considérablement rétracté ; ceux des tubes B et C n'ont guère diminué de volume.

(1) *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1907, IX, p. 579.

Il résulte de l'ensemble des expériences citées ci-dessus que le rôle des plaquettes dans l'élaboration de la thrombine est considérable. Mais est-il vraiment prédominant? Sont-elles plus aptes encore à fournir la thrombine que ne le sont les leucocytes, dont l'intervention est depuis longtemps jugée essentielle dans l'acte de la coagulation? L'étude des exsudats péritonéaux démontre, à n'en pas douter, qu'on doit attacher plus d'importance au rôle des plaquettes qu'à celui des globules blancs.

Lorsqu'on injecte, dans le péritoine de lapins, du bouillon ou simplement de la solution physiologique, il se forme, comme on sait, un exsudat où l'on ne trouve pas de plaquettes, mais qui est très riche en leucocytes vivants, et que l'on peut retirer par ponction en sacrifiant l'animal. S'il ne s'est produit aucune hémorragie, l'exsudat blanchâtre obtenu ne se coagule que très péniblement et par fractions ; des heures se passent souvent avant que la totalité du fibrinogène se soit convertie en fibrine. Certes la partie liquide d'un tel exsudat ne saurait être identifiée entièrement au plasma, dont elle diffère nettement : elle renferme moins de fibrinogène, elle contient de la mucine qui la rend visqueuse, elle est moins riche aussi, comme nous le verrons plus loin, en certains principes intervenant dans la coagulation. Néanmoins l'exsudat est apte à fournir des caillots typiques, son étude peut donc procurer des renseignements valables, et donne lieu notamment à l'importante constatation que voici : de pareils exsudats, qui malgré leur richesse extrême en leucocytes restent si longtemps liquides, se prennent en masse beaucoup plus vite lorsqu'on les additionne d'une dose même faible de suspension de plaquettes soigneusement lavées. On peut, pour rendre l'expérimentation plus aisée, oxalater l'exsudat dès qu'il est recueilli, et le scinder par centrifugation en deux portions, l'une contenant tous les leucocytes, l'autre limpide et qui en est débarrassée. Lorsqu'on recalcifie ces liquides, la coagulation peut s'opérer, lentement à vrai dire, mais c'est dans la portion leucocytaire qu'elle se montre d'abord. Ceci prouve que les leucocytes jouent un rôle. Toutefois, il suffit d'ajouter à la portion limpide une trace de plaquettes pour que la coagulation s'y effectue plus vite que dans la portion chargée de globules blancs. Ceux-ci pourtant représentent une

quantité de matière bien supérieure à celle, provenant des plaquettes, que l'on a mise en œuvre dans l'autre liquide.

L'exsudat qu'on obtient ainsi chez le lapin après injection de solution physiologique ne remplit généralement pas toutes les conditions désirables, en ce sens qu'il est souillé souvent de traces de sang extravasé que trahit la présence de rares globules rouges. Aussi vaut-il mieux s'adresser au cobaye, lequel fournit des exsudats blancs qu'il suffit de centrifuger pour obtenir, sans que la décalcification soit nécessaire, un liquide surnageant pratiquement incoagulable par ses propres moyens :

On injecte le soir 10 cent. cubes de bouillon dans la cavité péritonéale de deux cobayes. On ponctionne le lendemain matin et l'on recueille plusieurs centimètres cubes d'un exsudat blanc très peu coagulable, extrêmement riche en leucocytes. Une partie est conservée telle quelle, une autre est centrifugée et fournit par décantation un liquide surnageant très limpide. D'autre part, on s'est procuré, par saignée à la carotide et suivant la technique habituelle, une suspension de plaquettes bien lavées de cobaye.

Exp. X. — Dans deux tubes A et B on répartit 0,3 cent. cube d'exsudat leucocytaire non centrifugé, on ajoute volume égal de solution physiologique. On introduit ensuite dans A une goutte de suspension assez diluée de plaquettes (dans la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000). Au bout d'une heure, la coagulation s'est faite en A. Le liquide B est encore liquide après 4 heures; on le trouve coagulé le lendemain.

Exp. XI. — Le liquide surnageant limpide obtenu par centrifugation de l'exsudat est distribué à dose de 0,3 cent. cube dans deux tubes que l'on additionne de 0,3 cent. cube de solution physiologique et de 0,3 cent. cube d'EPCa. L'un des tubes reçoit en outre deux gouttes de la suspension de plaquettes; la coagulation s'y effectue en 50 minutes; l'autre mélange est encore liquide le lendemain.

Ces deux expériences sont réalisées, bien entendu, aussi tôt que possible après la récolte de l'exsudat. Celui-ci, gardé tel quel, ne se coagule spontanément que le lendemain. L'exsudat débarrassé des leucocytes est encore fluide après deux jours. Bien entendu, de pareils exsudats sont susceptibles de se coaguler assez rapidement sous l'influence du sérum, mais nous reviendrons plus loin sur ce point.

Ces expériences mettent en lumière la supériorité (admise par Lesourd et Pagniez et même antérieurement par Morawitz) des plaquettes sur les leucocytes comme agents de la coagulation. Les exsudats leucocytaires, assez rebelles à la coagula-

tion spontanée et aptes corrélativement à fournir par centrifugation un plasma quasi incoagulable par ses propres moyens, se comportent — c'est un rapprochement qui s'impose — à la manière du sang d'oiseau qui (soigneusement préservé du contact avec la plaie) se maintient longtemps liquide, ainsi que Delezenne l'a montré. Tous deux, le sang d'oiseau et l'exsudat, renferment des leucocytes, mais sont dépourvus de plaquettes. Débarrassé autant que possible de ses plaquettes, le plasma sanguin de lapin se coagule lentement et ne fournit que des traces de thrombine. Etant donné le contraste très frappant entre un tel plasma et celui qui a conservé ses plaquettes, il semble légitime d'admettre que si la centrifugation réussissait à éliminer totalement ces éléments, et s'il était possible en outre d'empêcher les plaquettes de libérer par diffusion des traces de leur principe actif, on obtiendrait un plasma de lapin se comportant exactement comme celui d'oiseau, c'est-à-dire à peu près incoagulable spontanément, même en milieu calcifié. Il nous est arrivé parfois d'obtenir des plasmas limpides si bien épurés de leurs plaquettes, qu'après recalcification ils exigeaient deux heures et demie pour se coaguler à une température voisine de 15 degrés. Il fallait attendre près de deux heures pour observer la formation d'un anneau de caillot, à la surface du liquide au contact du verre. Et la pénurie en thrombine se trahissait en ce que la coagulation ne se propageait que fort péniblement à la masse entière du liquide, même si à ce moment on le soumettait à une défibrination énergique; la séparation de la fibrine s'effectuait en plusieurs fois; on devait défibriner très longtemps pour obtenir un sérum entièrement débarrassé de fibrinogène et incapable de se coaguler à nouveau (1).

Une expérience complémentaire, dont nous dirons un mot,

(1) De tels plasmas qui se coagulent lentement et en plusieurs fois conviennent spécialement à l'observation des diverses phases de la coagulation. Une première coagulation donne après défibrination un liquide bien limpide. Quelque temps après, on voit ce liquide se troubler par l'apparition non pas de filaments de fibrine, mais d'un véritable précipité d'aspect pulvérulent formé de particules qui ne semblent nullement adhérer les unes aux autres : des oscillations imprimées au liquide y font naître des ondes soyeuses semblables à celles que l'on observe en inclinant des suspensions microbiennes un peu diluées. Puis l'aspect change, une coagulation véritable survient. Les particules semblent alors enrobées dans une gangue visqueuse

nous a confirmés dans l'idée que si le plasma limpide, même bien centrifugé, se coagule encore sans difficulté extrême par recalcification, cela tient à ce qu'il renferme encore des plaquettes ou peut-être seulement des débris de ces éléments : on peut obtenir, par l'action de l'eau distillée, de CO^2 et de la centrifugation, un plasma incoagulable spontanément mais coagulable par l'addition de plaquettes. Et l'on a de bonnes raisons de croire que ce traitement a eu pour effet d'éliminer complètement les plaquettes.

Exp. XII. — Du plasma oxalaté limpide de lapin, versé dans un tube A, est additionné de 9 volumes d'eau distillée ; on y fait passer ensuite un courant de CO^2 ; il se produit un trouble net, pas très intense cependant. On centrifuge très énergiquement, puis l'on décante dans un tube B environ la moitié supérieure du liquide, en veillant à ne retirer aucune trace du précipité qui adhère d'ailleurs au fond et aux parois du tube. Le sédiment est ensuite agité dans le reste du liquide qu'on a laissé dans le tube A. On dispose donc de deux plasmas dilués, l'un A, qui renferme tout le précipité, l'autre B, qui en est privé. On les resale jusqu'à teneur normale en NaCl, puis les recalcifie (à 5 cent. cube de chaque liquide on ajoute 0,2 cent. cube de NaCl à 20 p. 100 et 0,2 cent. cube de $CaCl^2$ à 5 p. 1000). On trouve que B ne se coagule pas, même le lendemain, tandis que A se coagule en 55 minutes. Mais si dans 0,5 cent. cube de B on introduit une goutte de suspension de plaquettes lavées, la coagulation s'opère en une demi-heure.

Ce qui, d'autre part, fait penser que l'absence de coagulation spontanée du liquide A est due à une élimination absolue des dernières traces de plaquettes, c'est que le barbotage de CO^2, dans une suspension de plaquettes allongée au préalable de plusieurs volumes d'eau distillée, y détermine une violente agglutination de ces éléments qui se condensent en filaments compacts aptes à se déposer vite et qui ainsi s'éliminent aisément du liquide (1).

On obtient encore un plasma dilué B, incoagulable spontanément, mais coagulable par l'addition pure et simple de plaquettes, si l'on traite par l'eau distillée et CO^2 un plasma

qui se les incorpore en devenant filamenteuse et est entraînée par la défibrination ; on enlève ainsi une nouvelle fraction du fibrinogène transformé en fibrine, le liquide redevient limpide. Au bout de quelque temps, nouveau trouble et répétition des mêmes phénomèmes. L'opinion, généralement admise d'ailleurs, que la coagulation débute par une précipitation, semble bien d'accord avec l'observation.

(1) CO^2 ne précipite pas les plaquettes lorsque celles-ci baignent dans la solution physiologique.

oxalaté qui, ayant été insuffisamment centrifugé, contient sûrement de nombreuses plaquettes ; on les retrouve dans le sédiment centrifugé, lequel, agité dans le liquide, lui communique la coagulabilité spontanée après rétablissement de la teneur saline et récalcification.

Si donc la coagulation d'un sang complet, contenant tous ses éléments cellulaires, fournit, comme Nolf l'a constaté (1), un sérum plus riche en thrombine que celle d'un plasma centrifugé, c'est essentiellement à l'existence des plaquettes qu'il convient d'attribuer la raison d'être de ce fait. Pour apprécier entièrement leur rôle, il faut tenir compte de ce qu'elles se trouvent dans le sang en nombre énorme, et de ce que, comme nous le préciserons plus loin, une trace de plaquettes suffit déjà à produire une dose fort notable de thrombine. On doit considérer aussi ce fait, signalé par tous les observateurs et aisément vérifiable, que les plaquettes s'accolent volontiers aux corps étrangers, c'est-à-dire s'accumulent précisément aux points où s'exerce l'influence de contact si décisive dans le processus de formation de la thrombine aux dépens des substances mères. On conçoit dès lors la supériorité, au point de vue de l'aptitude à la coagulation par ses propres moyens, du sang de mammifères sur celui des oiseaux, qui, même au contact du verre, reste longtemps fluide. C'est aux plaquettes qu'est due cette supériorité. Elles permettent au sang de mammifères de se coaguler rapidement sans le secours du suc de tissu, pourvu bien entendu qu'un contact soit établi avec un corps solide mouillable.

(*A suivre.*)

(1) *Archives internationales de Physiologie*, 1908.

RECHERCHES SUR LA LÈPRE

(PREMIER MÉMOIRE)

LA LÈPRE DES RATS
(LEPRA MURIUM)

par E. MARCHOUX et F. SOREL.

UBIQUITÉ DE LA MALADIE.

En 1903, Stefansky (1) a fait connaître une maladie des rats, causée par un bacille acido et alcoolo-résistant qui se multiplie chez ces rongeurs en provoquant des lésions comparables à celles que le bacille de Hansen produit chez l'homme. Le savant russe qui, pour la prophylaxie antipesteuse, examinait quotidiennement à Odessa un grand nombre de rats, avait été frappé de voir que beaucoup d'animaux étaient porteurs de ganglions volumineux sans présenter aucun symptôme de peste. La coloration de Ziehl lui révéla dans ces organes la présence d'un bacille spécial qui s'y était multiplié avec une abondance extrême et qu'il rechercha ensuite systématiquement. Il le trouva chez 5 p. 100 des rats d'égouts qui lui furent apportés. Des 3 espèces vivant à Odessa, *Mus rattus*, *M. alexandrinus* et *M. norvegicus*, seule cette dernière fournit des malades.

La lèpre des rats est répandue dans le monde entier. — La maladie découverte par Stefansky paraît être aussi répandue que le rat d'égouts. Elle a été signalée à Berlin par Lydia Rabinowitch (2); en Angleterre, par George Dean (3); en Australie,

(1) STEFANSKY, Eine lepraähnliche Erkrankung der Haut und der Lymphdrüsen bei Wanderratten. *Centr. f. Bakt. Orig.*, t. XXXIII, 1903.

(2) LYDIA RABINOWITCH, Ueber eine durch saüre-feste Bakterien hervorgerufene Hauterkrankung der Ratten. *Centr. f. Bakt. Orig.*, t. XXXIII, 1903.

(3) G. DEAN, A disease of the rat caused by an acid-fast bacillus. *Centr. f. Bakt. Orig.*, t. XXXIV, 1903.

— Further observations on a leprosy-like disease of the rat. *Journ. of hyg.*, t. V, 1905.

par Tidswell Frank (1) et J. R. Bull (2); aux Etats-Unis, par W. Wherry (3), Mc Coy (4) et A. Walker (5); en Roumanie, par Mezincescu (6) et Alexandrescu (7); au Japon, par Kitasato (8) et en Nouvelle-Calédonie, par A. Lebœuf (9). Aux îles Hawaï, Brinckerhoff (10) l'a recherchée vainement sur 16.000 rats. Ehlers, Bourret et With (11) ne l'ont pas trouvée aux Antilles danoises (Sainte-Croix). Nous l'avons rencontrée assez facilement parmi les rats des égouts de Paris. Sur 1.296 rats que nous avons systématiquement examinés, 65 étaient porteurs de bacilles acido-résistants, soit 5 p. 100. C'est, comme on le voit, la proportion qui a été trouvée par Stefansky à Odessa. Ces chiffres se rapportent au nombre global des animaux autopsiés, mais le pourcentage varie beaucoup suivant l'origine des rongeurs. Comme Mc Coy l'a reconnu à San-Francisco, nous avons constaté pour certains lots de rats capturés dans des dépôts d'os, dans les clos d'équarrissage et aux abattoirs une proportion de malades plus forte, s'élevant 14, 19 et même 45 p. 100.

Elle est spéciale aux rats d'égouts. — Tous les animaux porteurs de bacilles étaient des rats d'égouts. C'est là une cons-

(1) Tidswell Frank, Note on leprosy-like disease in rats. *Reports of the board of health on leprosy in New South Wales*, 1904, et *Lepra*, t. VI, 1906.

(2) J. R. Bull, Leprosy-like disease of the rat. *Intercolon. med. journ. Australia*, Melbourne, 1907.

(3) W. B. Wherry, The leprosy-like diseases among rats on the Pacific coast. *Journ. of Amer. Med. Assoc.*, t. L, p. 1908.

— Notes on rat leprosy and on the fate of human and rat lepra bacilli in flies. *Public health reports*, 16 oct. 1908.

— Experiments on vaccination against rat leprosy. *Journ. of inf. diseases*, t. VI, 1909.

(4) G. W. Mc Coy, Leprosy-like disease in rats. *Public health reports*, 10 juillet 1908.

— Distribution of the leprosy-like disease of rats in San Francisco. *Public health reports*, 6 novembre 1908.

(5) A. Walker, A report of some cases of rat leprosy. *Journ. Amer. Med. Assoc.*, t. LI, 1908.

(6) Mezincescu, Maladie lépreuse des rats et ses relations avec la lèpre humaine. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1908 et 1909.

(7) J. Alexandrescu, Lepra Sobolanilor. *Thèse de Jasi*, 1908.

(8) Kitasato, Die Lepra in Japan, *2e conférence de la lèpre*, 1909, t. II.

(9) A. Leboeuf, Existence de *Lepra murium* en Nouvelle-Calédonie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, n° 7, juillet 1912.

(10) W. R. Brinckerhoff, Rat leprosy. *Public health bulletin*, n° 30, 1910.

(11) Ehlers, Bourret et With, Recherches sur le mode de propagation et les procédés de diagnostic bactériologique de la lèpre, *Bull. Soc. de Path. Exot.*, t. IX, 1911, p. 253.

tâtation qui concorde avec les observations faites par tous les auteurs. La maladie spontanée n'apparaît qu'à titre tout à fait exceptionnel chez des rats d'une autre espèce.

Dujardin-Beaumetz (1) a vu un rat blanc très fortement atteint. Ce rat provenait d'ailleurs des égouts parisiens, où on rencontre assez fréquemment des albinos. Les rats blancs ne sont qu'une variété de surmulots, la contamination de cet animal n'est donc pas surprenante. La maladie a été rencontrée chez *Mus rattus* au Punjab (2). Kitasato (3) a trouvé un *M. alexandrinus* atteint de *Lepra murium*. Ce sont là les deux seuls cas jusqu'à présent signalés de maladie de Stefansky en dehors des surmulots *M. norvegicus* ou *decumanus*.

La maladie.

L'affection des rats se présente sous deux formes qui ont été décrites par Stefansky : une purement ganglionnaire, l'autre musculaire et cutanée, celle-ci n'étant qu'un stade plus avancé de la première.

Forme ganglionnaire. — La forme ganglionnaire, la plus fréquente, ne se manifeste extérieurement par aucun signe et n'est qu'une découverte d'autopsie. Elle reste localisée aux ganglions axillaires, inguinaux ou sous-maxillaires. A Odessa et Berlin, ce sont les ganglions axillaires qui sont le plus souvent pris. Nous avons vu qu'à Paris les ganglions inguinaux sont infectés au moins aussi souvent que ceux de l'aisselle.

Les ganglions sont souvent augmentés de volume, durs, blanchâtres ; ils atteignent quelquefois des dimensions considérables. A la première période de la maladie, on peut en trouver qui présentent la grosseur d'un haricot. A la seconde, leurs dimensions sont parfois énormes; Mc Coy en a rencontré un qui mesurait 3 centimètres de long sur 1 cent. 5 de large. Mais si l'augmentation de volume des ganglions est commune dans la lèpre des rats d'égouts, on ne peut cependant

(1) Communication orale.

(2) Reports on plague investigations in India. *Journ. of hygiene*, t. VII, n° 6. décembre 1907, p. 911.

(3) *Loco citato.*

la considérer comme un signe caractéristique et un moyen de diagnostic de la maladie.

On trouve des rats infectés avec des ganglions relativement petits, alors que la plupart des animaux qu'on capture sont porteurs de ganglions volumineux sans trace d'infection. Cette observation tendrait même à faire croire que l'hypertrophie est due plutôt à une cause étrangère qu'à la lèpre elle-même.

Tous les groupes ganglionnaires peuvent être atteints ou seulement quelques-uns. Dans certains cas, rares d'ailleurs, nous n'avons trouvé de bacilles que dans un seul ganglion des groupes inguinaux ou médiastinaux; une seule fois, il s'agissait d'un ganglion axillaire.

Forme musculo-cutanée. — La forme musculo-cutanée est beaucoup plus rare. Stefansky ne l'a rencontrée que 9 fois; Mc Coy, 22 fois sur 13.500 rats, nous-mêmes 8 fois sur 1.296 rats, soit sur une proportion de 0,60 p. 100.

Les animaux sont cachectiques, se meuvent avec difficulté et peuvent quelquefois être pris à la main (G. Dean, Wm B. Wherry). Ils portent des plaques alopéciques plus ou moins étendues. La peau est épaisse, bosselée, très adhérente aux tissus sous-jacents; on y remarque parfois de vrais nodules qui peuvent atteindre les dimensions d'une noisette, mais qui, en général, sont plus étalés que dans la lèpre humaine. Les parties malades sont souvent ulcérées. Mc Coy signale la présence de ces ulcères comme plus fréquente (63,6 p. 100) que l'alopécie (55,5 p. 100).

A l'autopsie, on constate que, dans les cas les plus légers, la face interne du derme est chagrinée, recouverte de nodosités saillantes minuscules et quasi-microscopiques.

A une période plus avancée, la peau se détache difficilement, le tissu graisseux a disparu et a été remplacé par du tissu conjonctif assez serré.

Si, après avoir dépouillé le rat, on en examine la peau par transparence, les moindres épaississements se manifestent et permettent de préciser l'étendue et l'importance des lésions cutanées. Dans tous les cas que nous avons observés, la maladie était surtout développée dans la moitié postérieure du corps, tantôt à la partie dorsale, souvent à la partie ventrale.

L'infection, dans ce dernier cas, semblait toujours avoir eu pour point de départ le groupe ganglionnaire inguinal, s'être,



Fig. 1. — Peau d'un rat lépreux étalée et conservée en Kaiserling.

La photographie a été faite par transparence. Les taches noires indiquent les nodules.

ensuite, étendue de proche en proche vers la ligne blanche et surtout vers les flancs. Elle avait amené la formation d'une

sorte de plastron de tissu néoformé se terminant symétriquement en pointes dirigées vers la partie antérieure du corps.

Plusieurs fois, nous avons trouvé les ganglions sous-maxillaires hypertrophiés, et dans ces cas, comme dans celui de G. Dean, l'affection s'étendait à la glande sous-maxillaire.

Dans les organes profonds, on n'observe pas de lésions macroscopiques bien marquées. Mc Coy a vu de petites nodosités sur le péritoine et le péricarde pariétaux, dans le foie et la rate; G. Dean signale dans un cas la présence d'une petite zone de nécrose dans le foie. Personnellement, nous n'avons pas rencontré d'infection assez avancée pour qu'aient eu le temps de se produire dans les organes profonds, en dehors des ganglions lymphatiques et en particulier des ganglions du médiastin, des lésions visibles à l'œil nu.

Histologie pathologique.

Le parasite est toujours intracellulaire. — Le bacille de la lèpre du rat, comme celui de la lèpre humaine, est un parasite spécial des cellules mésodermiques dans lesquelles il se multiplie avec une extraordinaire abondance, paraissant gêner la cellule hôte par encombrement, plutôt que l'altérer par une sécrétion toxique. Si, dans les tissus, on en trouve des exemplaires qui semblent libres, c'est une constatation si rarement faite qu'on doit la considérer plutôt comme un accident de préparation que comme une réalité physiologique.

Comme tous les bacilles acido-résistants, le bacille de la lèpre du rat est protégé par sa gaine cireuse et résiste à la phagocytose.

Impuissantes à le faire disparaître, les cellules se distendent pour contenir la culture et en restreindre le développement. Mais leur résistance finit par être vaincue; la membrane d'enveloppe se rompt et les bacilles se répandent au dehors, promptement englobés d'ailleurs par les cellules voisines, même par les plus jeunes, car on rencontre des lymphocytes qui déjà contiennent des bacilles.

En général, la cellule malade est vite entourée d'un certain nombre d'autres qui l'aident à défendre l'organisme contre la pullulation microbienne. Ces cellules, véritables étais sans

cesse apportés pour soutenir l'édifice protecteur, englobent les germes dès qu'ils s'échappent et forment une barrière que l'infection ne franchit pas vite.

Toutes ces cellules sont hypertrophiées, pressées les unes contre les autres, quelquefois jusqu'à confusion de leur protoplasma qui s'est réuni pour constituer une cellule géante. Ce sont des cellules épithélioïdes qui forment par leur ensemble un véritable tubercule, mais un tubercule qui, comme l'ont montré Boinet et Borrel dans la lèpre, n'a pas la constitution du tubercule de la tuberculose et n'est point entouré d'une gaine de leucocytes polynucléaires.

Il se répand par les voies lymphatiques. — Du point d'inoculation, l'infection suit les trajets lymphatiques comme les cellules qui la convoient et gagne rapidement les ganglions de la région. D'abord peu nombreuses, les cellules parasitaires restent cantonnées près des voies afférentes, à la zone périphérique du ganglion, bientôt immobilisées par la volumineuse inclusion qu'elles portent et qui ne leur permet plus aucun mouvement propre. Elles forment des amas qui grandissent peu à peu autour de celles d'où est partie l'infection. Quand elles sont peu chargées de bacilles, elles peuvent se mobiliser, et vont alors constituer des foyers secondaires qui se développent à leur tour. Tous ces nodules finissent par se réunir et progressivement le ganglion est envahi tout entier. Les follicules comprimés diminuent de volume et disparaissent, remplacés par des traînées lymphocytaires qui forment comme des trajets entre les nodules bacillaires. Le ganglion ne présente aucune tendance à la suppuration.

Du ganglion, il gagne le tissu conjonctif circonvoisin. — Avant même d'avoir atteint un sérieux développement, l'infection, dépassant les limites du ganglion, s'étend de proche en proche; les cellules parasitées vont se loger dans les espaces lymphatiques du tissu conjonctif et y constituent de petits nodules qui continuent à essaimer autour d'eux. Le tissu conjonctif distendu, non seulement ne laisse plus de liberté aux organes qu'il enferme, mais il les comprime et en amène l'atrophie.

Mamelle. — La glande mammaire voisine est vite atteinte, le tissu conjonctif interlobulaire s'infiltre de cellules migratrices parasitées, s'épaissit, et les éléments glandulaires comprimés s'atrophient et disparaissent.

Muscles. — Le même phénomène se passe du côté des muscles. Les muscles peauciers sont infiltrés les premiers, mais ensuite la maladie gagne en profondeur. Elle se répand dans les muscles abdominaux, thoraciques et même dans les muscles moteurs des membres. Les fibres musculaires s'écartent et s'atrophient par suite du développement excessif du tissu conjonctif interfasciculaire. C'est ce processus de raréfaction des fibres par compression que nous avons observé dans tous les cas; nous n'avons pas, comme Stefansky, George Dean, Alexandrescu, constaté l'envahissement de la fibre striée elle-même. La destruction des muscles moteurs entraîne une impotence fonctionnelle telle que dans certains cas le rat lépreux se meut difficilement et peut être capturé à la main.

Tissu sous-cutané. — Mais c'est du côté du tissu conjonctif sous-cutané et du côté du derme que l'envahissement microbien est le plus accentué. Les bacilles y sont amassés en nodules énormes, comme dans les ganglions lymphatiques. Leur disposition rappelle de très près ce qui se passe chez l'homme dans la lèpre. Les espaces lymphatiques du tissu conjonctif lâche sont non seulement distendus, mais le tissu lui-même se transforme; il devient dur, fibreux, cicatriciel; il présente le caractère succulent et lymphoïde d'un ganglion sclérosé. Gorgé de leucocytes parasités, il renferme aussi nombre de cellules fixes chargées de bacilles. C'est là une constatation qui ne doit guère surprendre, car les grands mononucléaires et les cellules conjonctives ont la même origine et les mêmes fonctions.

L'infection s'étend de proche en proche autour du ganglion et aussi du point d'inoculation. Elle arrive à provoquer le développement d'un véritable plastron qui double la peau et dans lequel toute trace de tissu graisseux a disparu.

Derme. — Dans le derme, l'infection débute par le tissu conjonctif lâche périvasculaire. Les cellules infectées se disposent

autour des vaisseaux, qu'elles enferment dans de véritables manchons où les bacilles abondent. Les glandes qui sont logées dans ces espaces très irrigués sont encerclées par les nodules lépreux. De ce fait, elles se trouvent mal nourries et finissent par s'atrophier. Nous n'avons jamais vu de bacilles dans l'intérieur des glandes ou des cellules glandulaires.

Les follicules pileux sont asphyxiés comme les glandes sébacées. C'est à leur atrophie que sont dues les plaques alopéciques dont sont porteurs les animaux malades.

Épiderme. — Les cellules migratrices parasitées envahissent de bonne heure la couche papillaire du derme et s'étendent comme un tapis au-dessous de la couche germinative de l'épiderme. Quelques-unes se glissent entre les cellules de Malpighi, pénètrent même à leur intérieur et, en tout cas, les infectent.

Il n'est pas rare de voir certaines régions de l'épiderme dans lesquelles presque toutes les cellules des diverses couches contiennent des bacilles en plus ou moins grand nombre. Mais la cellule de Malpighi résiste moins facilement à cette infection que la cellule mésodermique, elle meurt et se détruit. C'est à cette nécrose que sont dus les ulcères observés chez les rats lépreux.

Intégrité relative des viscères. — L'envahissement successif du tissu conjonctif se produit très lentement et il faut sûrement plus d'une année pour qu'il prenne le développement dont nous venons de parler. En général, l'animal malade meurt d'une maladie intercurrente avant que l'infection soit aussi étendue. Rarement on trouve un rat porteur de lésions considérables du foie, de la rate ou du système nerveux. Ce qu'on rencontre parfois, ce sont de petits nodules dans le foie, la rate, le rein ou la vessie; Mc Coy, en particulier, a insisté sur ces lésions profondes. Mais ordinairement ces organes sont macroscopiquement indemnes. Entre eux et l'infection, le poumon joue le rôle de tampon.

Rôle protecteur du poumon. — Il arrête les bacilles qui ont pénétré dans le système circulatoire sanguin. Voici par quel mécanisme.

De bonne heure le poumon reçoit des bacilles par deux voies :

1° *La voie sanguine.* — Les cellules jeunes renfermant peu de bacilles et par conséquent mobilisables, se trouvent parfois en pénétrant dans les sinus des ganglions lymphatiques, entraînées par le torrent circulatoire et dirigées vers le poumon avec le sang de la petite circulation ;

2° *La voie lymphatico-sanguine.* — Il s'échappe aussi par les voies lymphatiques efférentes quelques leucocytes parasités, qui par les veines lymphatiques ou le canal thoracique aboutissent au poumon.

Aussi cet organe renferme-t-il toujours des bacilles acido-résistants, même dès le début de l'infection. C'est en particulier dans les sommets qu'il faut les chercher. Il nous est arrivé maintes fois d'en rencontrer dans cette région du poumon, alors que nos recherches dans les lobes inférieurs demeuraient vaines. Des frottis de pulpe permettent de juger de leur abondance et les coupes montrent leur siège. Là comme ailleurs, les bacilles sont toujours intracellulaires, inclus dans les phagocytes spéciaux du poumon, les cellules à poussières. Mais, quel que soit le stade de la maladie auquel on fasse cet examen, leur nombre n'est jamais considérable et on ne voit pas comme ailleurs se former de nodules dans cet organe. Les cellules parasitées restent toujours isolées.

Elles gagnent individuellement les ganglions de la région, les ganglions médiastinaux qu'on trouve toujours malades.

L'infection rencontre donc là une nouvelle barrière à son extension et elle y demeure cantonnée longtemps avant de diffuser par ailleurs. Sans doute ce système défensif n'est pas parfait. Il se trouve parfois en défaut, et quelques bacilles échappent à cette sorte de filtre. D'autre part, il arrive un moment où il est débordé.

Mais il est certain qu'il oppose, pour un temps, un solide obstacle à la diffusion microbienne.

Le même phénomène intervient sans doute aussi dans la tuberculose, mais avec beaucoup moins de succès parce que le bacille de Koch est toxique et entrave très vite la mobilité cellulaire. Les leucocytes chargés de microbes ne quittent pas le poumon, où ils deviennent le centre d'un tubercule.

Inoculations expérimentales.

Stefansky, Lydia Rabinowitch n'ont pas pu transmettre la maladie par inoculations. G. Dean, plus heureux, a contaminé des rats blancs. Après lui, Mc Coy, Alexandrescu et d'autres ont également réussi.

Nous avons constaté que, loin d'être difficile à inoculer, la lèpre du rat est, au contraire, d'une diffusion particulièrement commode. La raison des insuccès des premiers auteurs réside dans l'observation trop peu prolongée des animaux d'expérience. La multiplication des germes se fait très lentement dans l'organisme des rongeurs infectés et parfois même avec une lenteur singulière. Elle n'est décelable qu'après deux ou quatre mois et même parfois plus encore.

Lorsqu'on introduit dans le péritoine de grosses quantités de bacilles, on voit se développer des infections massives, comme celles qu'a produites G. Dean et dont nous possédons, grâce à l'obligeance de ce savant, un remarquable échantillon.

Mais ces injections copieuses, qui avaient leur importance quand il s'agissait de prouver que la maladie est transmissible d'animal malade à animal sain, ne présentaient, pour nous qui avions un tout autre objectif, qu'un intérêt secondaire.

Par la voie sous-cutanée, nous sommes parvenus sans peine à infecter des rats sains.

Les rats blancs sont aussi sensibles que les rats gris. — Pour nos premières expériences, nous avons employé des rats d'égouts. En les choisissant jeunes, nous croyions nous mettre à l'abri d'infections spontanées; mais, devant les observations qu'il nous a été donné de faire ensuite, nous avons dû renoncer à nous en servir. De très jeunes animaux ont été reconnus infectés; d'autre part, la proportion élevée des malades, dans certains lots, ne permettait plus de tabler sur un taux à peu près constant de 5 p. 100 pour les contaminations naturelles. Les rats blancs d'élevage ont donc remplacé les rats sauvages dans nos expériences et, contrairement d'ailleurs à ce que nous pensions, se sont montrés aussi sensibles qu'eux à la maladie.

Insertion sous la peau de tissu infecté. — Au début de nos recherches sur l'aptitude des rats à prendre la lèpre par inoculations discrètes, nous restions encore impressionnés par les insuccès des premiers expérimentateurs.

Aussi, la première méthode que nous ayons employée avait-elle pour but de protéger temporairement des phagocytes les bacilles introduits sous la peau. Elle permettait aux germes de vivre un certain temps dans un milieu de culture auquel ils étaient habitués et d'acquérir, pensions-nous, une résistance suffisante aux moyens défensifs de l'organisme. Elle consistait à insérer dans le tissu conjonctif, par une boutonnière faite à la peau, un fragment de tissu renfermant beaucoup de bacilles A. R. (1) et fraîchement retiré d'un rat malade.

L'expérience que nous rapportons ci-dessous a été faite à la fois sur des rats gris et des rats blancs. Elle permettra d'apprécier la sensibilité relative des deux espèces.

Exp. I. — Un rat gris, mort récemment de mort violente, porte dans l'aine gauche un énorme ganglion contenant de très nombreux A. R. De petits fragments, de la taille d'un grain de millet, en sont découpés et insérés par une boutonnière sous la peau du ventre de 6 rats blancs et de 8 rats gris. L'inoculation est faite le 26 juillet 1909.

Le 27 août, un rat gris est tué accidentellement au moment de l'examen. On ne trouve à l'autopsie aucune trace du fragment introduit. Il y a de rares A. R. dans les ganglions inguinaux droits et gauches.

Le 28, un deuxième rat gris est trouvé dans la cage, mort et en partie dévoré. On peut néanmoins faire quelques frottis d'un ganglion dans lequel on trouve un petit nombre de bacilles de Stefansky.

27 septembre. — Un troisième rat gris est mort. Pas d'A. R., pas de traces du matériel d'inoculation.

28 septembre. — Un quatrième rat gris est mort et ne renferme pas non plus de bacilles.

13 octobre. — Cinquième rat mort. Pas d'infection.

14 octobre. — Sixième rat gris. Pas d'infection.

27 octobre. — Septième rat gris, sacrifié. Au point d'inoculation, se trouve une plaque de tissu fibro-conjonctif assez épaisse dans laquelle se rencontrent des masses considérables de bacilles A. R. Les ganglions inguinaux renferment aussi un petit nombre de bacilles.

11 mars 1910. — Le dernier rat gris est mort. Au point d'inoculation s'est développé un nodule de tissu conjonctif infiltré de nombreux bacilles. La peau est ulcérée par-dessus. Des bords de l'ulcère, par grattage et frottis, plusieurs préparations sont faites qui renferment de nombreux bacilles. Les

(1) Nous emploierons souvent dans le cours de ce mémoire la formule abréviative A. R. pour *acido-résistant*,

éléments microbiens existent en grand nombre aussi dans les ganglions. Il n'y a pas de généralisation de la maladie.

Le premier rat blanc meurt le 25 novembre 1909. Au point d'inoculation, tissu conjonctif épaissi, chagriné, chargé de cellules migratrices pleines d'A. R. Les ganglions de la région ne sont pas perceptibles; on les trouve à l'autopsie très petits, de la grosseur d'une tête d'épingle; ils ne renferment que très peu de bacilles.

18 décembre. — Un deuxième rat blanc est sacrifié. Nombreux bacilles au point d'inoculation, au milieu d'une plaque épaisse de tissu conjonctif. Ganglions très petits, renfermant très peu d'A. R.

26 décembre. — Troisième rat blanc trouvé mort dans la cage et complètement putréfié. A. R. au point d'inoculation.

28 décembre. — Quatrième rat blanc mort. Au point d'inoculation, nodule de tissu conjonctif, dur et noirâtre, très riche en bacilles. Ganglions peu infectés.

3 février 1910. — Cinquième rat blanc mort. A. R. nombreux au point d'inoculation. Ganglions très petits, avec quelques bacilles seulement.

6 février 1910. — Le sixième rat blanc meurt. Nodule au point d'inoculation volumineux et bourré d'A. R. Quelques bacilles dans les ganglions de l'aine et dans ceux de l'aisselle.

En somme, des 14 rats inoculés, 8 gris et 6 blancs, 10 se sont infectés. L'insertion d'un fragment de ganglion infecté dans le tissu conjonctif sous-cutané devient donc, dans la plupart des cas, le point de départ d'une infection qui, à la vérité, ne montre pas de tendances envahissantes. Il se fait une sorte de culture *in situ*, derrière une barrière de cellules épithélioïdes dont l'accumulation donne naissance à un nodule parfois volumineux. Les ganglions de la région sont atteints tardivement et ne deviennent le siège d'une forte infection que lorsque le nodule a pris assez de développement pour arriver au voisinage du paquet ganglionnaire.

En général, les rats meurent avant que la maladie ait fait de tels progrès. On a de la peine à conserver quelques-uns de ces rongeurs en cage pendant plus d'un an. Ils finissent par succomber presque tous à une sorte de pseudo-tuberculose qui débute de façon insidieuse et se transmet avec une singulière facilité.

Dans cette expérience, comme dans toutes celles où les deux espèces ont été employées concurremment, les rats blancs se sont montrés plus sensibles que les rats gris. Tous se sont infectés, alors que 4 rats gris sont morts sans qu'on ait pu trouver chez eux le moindre bacille. A l'autopsie, les A. R. étaient rencontrés en nombre colossal dans le nodule d'inoculation; on n'en trouvait ailleurs que dans les ganglions et en très petit nombre. Au lieu de ces foyers compacts qui existent toujours dans la lèpre spontanée, on ne voyait que des cellules isolées renfermant quelques bacilles.

Injection sous-cutanée de suspension bacillaire. — Puisque les rats d'expérience se montrent si sensibles, il n'était donc point nécessaire de s'entourer de précautions spéciales pour assurer l'infection. En effet, l'inoculation sous-cutanée d'un peu de liquide obtenu par broyage de ganglions infectés en eau physiologique stérile a donné des résultats aussi constants que l'insertion d'un fragment sous la peau. Dans ce cas, l'infection n'est pas toujours très marquée au point d'inoculation, mais elle gagne vite les ganglions qu'on trouve presque farcis de bacilles.

Nous donnons l'expérience suivante à titre d'exemple :

Exp. II. — 21 juin 1910. Un rat d'expérience est sacrifié. Il porte un ganglion inguinal rempli de bacilles A. R. Ce ganglion est broyé en eau physiologique et donne par dépôt rapide une suspension louche où les bacilles sont très abondants. 8 petits rats blancs sont inoculés sous la peau du dos au voisinage de la base de la queue, avec une goutte de ce liquide.

27 juillet. — Un rat meurt de pseudo-tuberculose. Au point d'inoculation, pas d'A. R. On en trouve quelques-uns dans le ganglion inguinal du côté droit.

15 septembre. — Un deuxième rat succombe. A. R. rares au point d'inoculation, nombreux dans les ganglions inguinaux.

20 septembre. — Mort de trois rats. L'un renferme de nombreux A. R. dans les ganglions. Le deuxième en présente de très nombreux dans les ganglions et au point d'inoculation. Le troisième, très peu dans les ganglions, pas du tout au point d'inoculation.

27 septembre. — Un sixième rat trouvé mort renferme beaucoup d'A. R. dans les ganglions inguinaux et pas du tout au point d'inoculation.

1er octobre. — A. R. très nombreux dans les ganglions inguinaux du septième rat; très nombreux aussi au point d'inoculation et dans le tissu conjonctif de la région abdominale jusqu'au voisinage de la ligne blanche.

11 octobre. — Le dernier rat meurt. Il porte des ganglions inguinaux volumineux des deux côtés. Dans les frottis, on trouve des A. R. à droite et à gauche, mais alors qu'ils sont rares à gauche, ils sont très nombreux à droite. Rien au point d'inoculation.

Cette expérience montre que la phagocytose n'était pas à redouter pour le bacille et que nos premiers essais étaient entourés d'inutiles précautions. Les phagocytes manifestent à la vérité une sensibilité chimiotactique particulièrement grande vis-à-vis du bacille de Stefansky. Mais celui-ci, bien défendu par sa cuirasse cireuse, tire plutôt un bénéfice de cette sensibilité, comme de la mobilité des cellules qui servent à le répandre dans l'organisme.

C'est à la mobilité des cellules parasitées qu'il faut

attribuer cette infection rapide des ganglions superficiels et le développement si rare d'un nodule au point d'inoculation.

Inoculation par scarification de l'épiderme. — Nous avons pensé qu'en raison de cette sensibilité des phagocytes au bacille de Stefansky, il devait être possible de provoquer plus facilement encore l'infection de nos animaux. Nous nous sommes contentés de beurrer avec de la pulpe septique des scarifications de la peau. Après avoir arraché les poils sur le dos, près de la base de la queue et sur une surface équivalente à celle d'une pièce de 2 francs, nous avons pratiqué au bistouri des entailles peu profondes et avons frotté la région ainsi préparée avec un fragment de ganglion ou de tissu conjonctif renfermant de nombreux bacilles. Ce procédé d'inoculation s'est montré parfaitement efficace. Voici, comme preuve à l'appui, les résultats d'une expérience ainsi faite :

Exp. III. — 21 juin 1910. Un rat de cage 48, expérience 55, trouvé mort ce jour, porte au point d'inoculation un gros nodule bourré d'A. R. Ce nodule est broyé dans un verre avec seulement quelques gouttes d'eau physiologique. On obtient par cette trituration une pulpe assez épaisse et très riche en A. R. 6 petits rats sont frottés avec cette pulpe sur des scarifications de la peau pratiquées à la base de la queue. Ces rats sont enfermés dans deux bocaux.

20 octobre. — Un rat meurt. A l'autopsie, on constate que les lymphatiques de la mamelle sont injectés de granulations pigmentaires qui donnent à l'organe une teinte noire assez foncée et qui présentent la réaction des sels de fer avec le ferrocyanure de potassium. Ces granulations sont ovoïdes et régulières de forme et de dimensions.

Les ganglions, pigmentés aussi et de la grosseur d'un grain de millet, renferment, notamment à gauche, une très grande quantité d'A. R. Rien au point d'inoculation.

21 octobre. — Un deuxième rat est mort. A l'autopsie, on trouve les deux régions inguinales pigmentées. Des frottis de ce tissu pigmenté renferment quelques bacilles A. R. Dans les ganglions inguinaux relativement petits, les acido-résistants de chaque côté se montrent en très grand nombre. Pas d'A. R. dans les ganglions axillaires. Au point d'inoculation, pas de bacilles dans les produits de raclage de la face profonde de la peau ; nombreux au contraire dans les produits de raclage de la face externe intéressant l'épiderme et la couche superficielle du derme.

25 octobre. — Un troisième rat est mort aujourd'hui. A. R. nombreux dans les ganglions inguinaux pigmentés comme le tissu de la mamelle et légèrement augmentés de volume, nombreux aussi dans le produit de raclage de la couche superficielle de la peau au point d'inoculation.

3 janvier 1911. — Un quatrième rat est sacrifié. Il porte des ganglions assez volumineux et pigmentés comme le tissu voisin, remplis d'A. R. Au point

d'inoculation et dans toute la région qui l'avoisine, la peau est farcie d'A. R.

15 janvier. — Un rat, le cinquième, est mort. A. R. nombreux dans les ganglions inguinaux. Quelques-uns dans les ganglions axillaires.

25 janvier. — Le dernier rat est sacrifié. Les ganglions inguinaux, assez volumineux, renferment un très grand nombre d'A. R. On ne constate pas d'extension de l'infection dans le tissu conjonctif périphérique.

Comme on le voit, l'infection de tous les rats d'expérience a été obtenue, c'est-à-dire que l'inoculation dans la couche superficielle de la peau semble plus grave que l'introduction de bacilles dans le tissu conjonctif sous-cutané. Cette expérience, qui n'est qu'un exemple, a été répétée un grand nombre de fois avec le même succès.

On constate à l'autopsie que les bacilles A. R. gagnent très vite les ganglions de la région d'inoculation, où l'infection est toujours très marquée. La couche superficielle du derme contient au point d'inoculation un grand nombre d'A. R. L'épiderme est indemne et les cellules en tel état, qu'aucun signe extérieur d'infection n'est perceptible à cet endroit. La multiplication des bacilles ne s'est pas faite sérieusement en profondeur pendant le temps qu'a duré l'expérience. Les poils n'étaient nullement atteints dans leur vitalité, comme ils le sont quand le follicule est inclus dans une couche de cellules mésodermiques parasitées.

La zone de tissu conjonctif intermédiaire entre le point d'inoculation et les ganglions inguinaux n'a jamais été trouvée infectée. Il semble donc que les bacilles ne se soient pas arrêtés dans les lymphatiques qu'ils ont empruntés pour gagner le ganglion.

Pénétration des bacilles au travers de la peau fraîchement épilée. — Devant un succès si complet avec une porte d'entrée si étroite, nous avons voulu savoir si une lésion plus superficielle encore que des scarifications de l'épiderme ne suffirait pas à la pénétration des germes. Pour produire l'infection, il nous a suffi de toucher avec un tampon de coton imbibé de liquide septique la peau simplement épilée.

Exp. IV. — Les ganglions d'un rat 282 renfermant de nombreux A. R. sont broyés avec un peu d'eau physiologique et donnent un liquide louche renfermant un très grand nombre d'A. R. Avec un tampon de coton imbibé de

ce liquide, on frotte *doucement* un espace épilé de la peau de 6 rats adultes. La surface épilée, de la dimension d'une pièce de 2 francs, est située à la base de la queue. L'opération est faite le 4 décembre 1910.

18 janvier 1911. — Un de ces rats a été soigné de la gale avec une pommade au crésol et il est mort. On fait un grattage de la peau au point d'inoculation. Dans aucun des frottis, il ne se rencontre d'A. R. Cependant, dans une préparation faite avec la pulpe d'un ganglion de l'aine, l'examen microscopique décèle la présence d'un amas d'A. R.

2 mai 1911. — Un deuxième rat est sacrifié. Rien au point d'inoculation. A. R. en petit nombre dans les ganglions inguinaux.

26 mai 1911. — Un troisième rat est sacrifié. Ganglions inguinaux assez volumineux à gauche. L'examen microscopique montre qu'ils renferment beaucoup d'A. R.

23 juillet. — Un quatrième rat femelle est mort de septicémie hémorragique (accident de parturition). Il y a de très nombreux A. R. dans les ganglions inguinaux, dans le tissu conjonctif de la mamelle et dans l'épaisseur de la peau au point d'inoculation.

2 octobre. — Le cinquième rat est mort. Ulcère à A. R. au point d'inoculation. Nombreux bacilles dans les ganglions inguinaux, quelques-uns se rencontrent dans les ganglions axillaires.

28 novembre. — Le dernier rat est mort. On ne trouve d'A. R. ni au point d'inoculation, ni dans les ganglions inguinaux, mais les ganglions bronchiques en renferment en grand nombre. Quelques amas se rencontrent aussi dans le poumon.

Comme on le voit, le dépôt de bacilles sur la peau épilée donne aux rats l'infection à tout coup. Sur 6 rats inoculés de cette façon, il y a eu 6 succès.

L'infection par cette voie semble même plus sûre que par toute autre. Alors que l'inoculation sous-cutanée reste parfois infructueuse, on a par scarification ou simple épilation 100 p. 100 de succès, ainsi qu'en témoignent les expériences rapportées ci-dessus à titre d'exemples et corroborées par un grand nombre d'autres que nous trouvons inutile d'exposer aussi.

Nous n'avons pas encore pu saisir le mécanisme de pénétration des germes. C'est une question qui est à l'étude et sur laquelle nous reviendrons plus tard.

Le bacille ne traverse pas la peau saine. — Si la moindre lésion superficielle, si la plus minime érosion de l'épiderme ouvre un chemin à la maladie, il convient de dire que les cellules épidermiques en état d'intégrité lui opposent une barrière infranchissable. Huit petits rats âgés de huit jours, encore glabres, mais avec une cicatrice ombilicale parfaite, ont été

largement badigeonnés avec du liquide de broyage ganglionnaire riche en A. R. et cela sans résultat. Aucun d'eux n'a pris la lèpre, alors que d'autres animaux inoculés avec le même produit se sont infectés.

En somme, l'inoculation du bacille de Stefansky provoque facilement une infection spécifique, et elle semble d'autant plus efficace qu'elle est plus superficielle, sans d'ailleurs qu'elle puisse se faire au travers de la peau saine.

Sensibilité de la souris. — Les rats blancs ne sont pas les seuls animaux sensibles à cette infection. Nous avons reconnu qu'il était possible de la communiquer à d'autres murins : les souris blanches. Voici une expérience :

Exp. V. — Le 22 janvier 1911, un rat de l'expérience 281 est sacrifié. Les ganglions inguinaux qui renferment un assez grand nombre d'A. R. sont broyés en eau distillée stérile. Avec ce liquide, 12 souris sont inoculées : 1°, 4 par injection sous-cutanée ; 2°, 4 par badigeonnage après scarification ; 3°, 4 par badigeonnage après arrachement des poils.

Première série. 9 février. — Une souris du 1er bocal est morte. Au point d'inoculation, elle porte un abcès dans lequel on ne trouve que quelques rares A. R. Pas de bacilles de la lèpre dans les ganglions, le foie, la rate et la peau voisine du point d'inoculation.

22 février. — Une 2e souris est morte. Au point d'inoculation se trouve du tissu conjonctif pigmenté, avec une tache un peu plus noire qui marque le point précis où a été faite l'injection. De nombreux bacilles infiltrent tous ces tissus. Pas d'A. R. dans les ganglions, le foie et la rate.

13 juin. — Un mâle du bocal I est sacrifié. Il porte de gros ganglions dans lesquels on rencontre beaucoup de cellules parasitées. Il y a des foyers très nets renfermant quelques cellules géantes.

20 novembre. — La dernière souris du 1er bocal meurt. Elle porte à la paroi abdominale, au voisinage de la région inguinale droite et s'étendant le long du pubis jusqu'à la région inguinale gauche, une vaste tumeur mamelonnée et composée de trois lobes ayant chacun le volume d'une noisette. Cette tumeur est formée de tissu lymphoïde et constitue un vaste nodule bourré d'A. R. Les ganglions inguinaux renferment beaucoup de bacilles. On n'en trouve ailleurs ni dans la peau, ni dans les organes.

Deuxième série. 1er mars 1911. — Le 1re souris du 2e bocal est morte. Quelques bacilles au point d'inoculation, rien dans les ganglions inguinaux.

16 juin. — Une femelle est sacrifiée. Au point d'inoculation, comme dans le ganglion inguinal droit, on trouve un gros bacille acido-résistant en navette, présentant souvent un espace clair central. Dans certains amas, quelques éléments contiennent un granule ou deux qui retiennent plus fortement la matière colorante rouge. Rien au point d'inoculation.

31 octobre. — Un mâle du bocal 2 est mort. Deux gros ganglions inguinaux sont bourrés de bacilles acido-résistants typiques. Sur le dos la souris porte un large ulcère, dans les parois duquel se trouvent des bacilles en

navette semblables à ceux qui ont été découverts dans la souris précédente.

6 novembre. — La dernière souris du 2e bocal est morte. Les ganglions inguinaux assez volumineux sont bourrés de bacilles A. R. typiques. Les bacilles sont nombreux aussi au point d'inoculation. Rien dans les ganglions axillaires, ni dans la rate.

Troisième série. 2 mai 1911. — La 1re souris du 3e bocal meurt ce jour. Elle porte des ganglions inguinaux assez volumineux. On n'y trouve pas d'A. R.

24 août. — Une 2e souris est morte. Dans le ganglion inguinal gauche se trouvent de nombreux A. R. en navette semblables à ceux qui ont été décrits plus haut. Rien dans le ganglion inguinal droit.

31 août. — Les deux dernières souris du 3e bocal sont sacrifiées. Nombreux amas de bacilles en navette.

Les souris peuvent donc prendre la lèpre. Mais elles y sont cependant moins sensibles que les rats. Même quand le nombre des bacilles est très grand, alors qu'ils amènent la formation de volumineux nodules, ils ne se répandent pas dans tout l'organisme, comme chez les rats.

Formes d'involution chez la souris. — Quand l'inoculation est superficielle, l'infection, loin d'être plus sûre comme chez le rat, manque souvent et, en tout cas, reste toujours discrète. Les bacilles subissent même une involution qui les rend méconnaissables. Et nous ne les aurions pas reconnus, si nous ne les avions observés dans presque toutes les souris inoculées par scarification ou épilation.

Chose curieuse, nous avons trouvé des bacilles semblables dans les ganglions inguinaux de rats inoculés avec des bacilles de lèpre humaine. Cette observation semblerait indiquer que les rats présentent à la lèpre humaine une sensibilité atténuée. En tout cas, cette sensibilité est moins grande que celle des souris à la lèpre murine, car nous avons inoculé des centaines de rats avec des bacilles humains ; nous les avons tous autopsiés, et si, chez quelques-uns, nous avons trouvé ces formes d'involution, jamais nous n'avons vu de bacilles typiques. Cette similitude d'involution peut sans doute être regardée comme un point de rapprochement entre les deux germes.

Insensibilité des autres animaux de laboratoire. — Alexandrescu a inoculé avec succès des cobayes. Nous avons essayé d'infecter plusieurs de ces animaux, mais en vain.

Nous n'avons pas mieux réussi avec un singe.

En somme, la lèpre murine est une maladie spécifique aux rats. Si on réussit à la communiquer à la souris, espèce voisine, elle n'y prend jamais un développement considérable. Cette spécificité est importante à considérer et à rapprocher de celle du bacille humain.

Le Bacille.

Le bacille découvert par Stefansky est, nous l'avons dit, d'une extraordinaire abondance dans les tissus malades.

Réactions colorantes. — Un frottis de pulpe ganglionnaire, un raclage de la peau, au voisinage d'un nodule ou d'un ulcère, renferme une quantité énorme de germes libres ou intracellulaires. Si l'on colore rapidement ce frottis par une couleur basique quelconque en solution hydroalcoolique, tous ces bacilles se détachent en négatif sur le fond teint, par le violet de gentiane par exemple. Il faut, pour les mettre en évidence, faire agir comme pour le bacille de Hansen, la solution phéniquée de fuchsine à la température de 50 à 80 degrés. Ils résistent ensuite à la décoloration par les acides aussi bien et même mieux que le bacille de la lèpre humaine; l'acide azotique au dixième, l'acide sulfurique au quart, l'alcool chlorhydrique à 3 p. 100 n'en altèrent pas la couleur rouge vif. On les voit se détacher avec la plus grande netteté sur le fond coloré par le bleu de méthylène. Nous employons, d'ordinaire, une solution étendue de bleu boraté qui a l'avantage de colorer en quelques secondes.

En définitive, le bacille de Stefansky prend le Ziehl plus vite que le bacille de Koch et résiste à la décoloration mieux que le bacille de Hansen débarrassé de sa gangue glaireuse (1). Il prend le gram.

Résistance des germes à la digestion phagocytaire. — Les cellules qui logent le bacille sont, comme nous l'avons dit.

(1) Voir à ce propos, E. Marchoux, culture d'un bacille acido-résistant provenant du mucus nasal des lépreux. *Bull. de la Soc. de Path. exot.*, t. IV, 1911, p. 89.

des cellules mésodermiques. Ce sont des leucocytes mononucléaires ou macrophages de Metchnikoff. Ce parasitisme des cellules de défense ne vient point à l'encontre de la théorie phagocytaire de l'immunité. Les phagocytes, ici, comme toujours, remplissent exactement leur rôle; ils s'emparent des germes et les isolent de l'organisme. Nous avons déjà fait ressortir la sensibilité chimiotactique très grande qui les attire vers le bacille de Stefansky. Mais leur pouvoir digestif se heurte à un très sérieux obstacle : la capsule cireuse qui entoure ce parasite spécial. Si la théorie de Metchnikoff avait encore besoin d'être défendue, elle trouverait en ces faits un sérieux appui et une preuve démonstrative que les phagocytes ingèrent les microbes vivants. Mais rien n'est parfait. Si bien réglées que soient les fonctions organiques, elles peuvent se trouver en défaut. Ici, les qualités mêmes des cellules phagocytaires servent au microbe. Sa résistance aux sucs digestifs met à son service la sensibilité chimiotactique des leucocytes pour favoriser son introduction et leur mobilité pour opérer sa diffusion dans l'organisme.

Les phagocytes ne sont cependant pas totalement désarmés contre lui. Nous voyons, au contraire, assez souvent, des bacilles devenus granuleux qui ont, par conséquent, mal résisté à leur action. Mais ce sont là des faits exceptionnels, il faut bien le reconnaître.

Absence de propriétés toxiques. — En général, le bacille de la lèpre du rat, comme celui de la lèpre humaine, vit et se multiplie dans la cellule phagocytaire qui, d'ailleurs, n'en paraît pas très fâcheusement influencée. Il ne s'agit pas là d'une infection à proprement parler, mais d'un véritable parasitisme. Le microbe ne se nourrit pas de la substance propre de la cellule, mais des mêmes substances qu'elle-même; aussi elle augmente de volume pour satisfaire à ses propres besoins et à ceux de son hôte.

Comparaison avec le bacille de Hansen. — Les mêmes phénomènes se passent dans la lèpre humaine, avec quelques variantes peu importantes; mais ils y sont moins perceptibles que dans la maladie du rat, qu'on peut reproduire expé-

rimentalement chez les animaux de laboratoire. Si les deux maladies se ressemblent, les bacilles qui causent chacune d'elles sont très voisins. Par le nombre des éléments qui s'amassent dans les tissus, le bacille de Stefansky se rapproche du bacille de Hansen; il s'en distingue par ses caractères de groupement. Comme celui-ci, il est toujours intracellulaire; les germes qu'on trouve disséminés dans la préparation proviennent des cellules détruites, comme les coupes permettent de s'en rendre compte. Les cellules parasitées sont particulièrement fragiles et résistent mal aux dommages du frottis. Mais on en trouve néanmoins toujours quelques-unes qui sont intactes et permettent de voir que les microbes sont disposés dans le protoplasma sans ordre et non pas rangés en paquets de cigares comme les bacilles de Hansen. Les bacilles de Stefansky ne sont pas, comme ceux de la lèpre humaine, entourés d'une gangue muqueuse; ils ne se disposent jamais en globies.

Ce caractère distinctif n'a peut-être pas, il est vrai, une très grande valeur, car il est impossible, actuellement, de décider si cette sécrétion glaireuse, cette glée, est d'origine microbienne ou provient de la cellule qui limite ainsi l'envahissement parasitaire. L'impossibilité d'inoculer la lèpre humaine aux animaux recule indéfiniment la solution de ce problème.

En général, les éléments mesurent de 3 à 5 μ de longueur sur 1/2 μ de largeur. Mais ces dimensions, si elles sont ordinaires, ne sont point constantes. Il est commun, au contraire, de rencontrer des germes plus longs et légèrement incurvés avec un bouton terminal à une extrémité. Dans chaque groupe bacillaire, il y a au moins un individu qui présente ces caractères.

Parfois le bacille de la lèpre du rat, comme son congénère humain, devient granuleux et prend cette disposition en chaînette, en coccothrix de Unna. Il y a même des cas où presque tous les bacilles ont cet aspect. Nous pensons qu'il s'agit non pas d'un stade particulier d'évolution, mais d'un processus de dégénérescence. Nous aurons occasion d'en donner plus loin des preuves évidentes.

Lydia Rabinowitch, qui a une connaissance si grande des acido-résistants, a reconnu que ce bacille se distingue très nettement de tous ceux qu'on obtient en culture. Il a, au con-

traire, une étroite ressemblance avec le bacille de la lèpre humaine. L'un et l'autre ont, dans l'organisme, le même habitat, causent une maladie du même genre, à incubation longue et à marche très lente. L'un et l'autre restent toujours contenus dans les cellules où ils se multiplient sans paraître fabriquer de substance toxique. Ni l'un ni l'autre n'a encore été sûrement obtenu en cultures successives *in vitro*.

Leur parenté est très grande, et on pourrait dire que la lèpre du rat est à la lèpre humaine comme la tuberculose aviaire est à la tuberculose de l'homme.

Commencement de culture et impossibilité de repiquage. — Tous les auteurs qui ont essayé de cultiver le bacille de la lèpre du rat n'y sont pas parvenus (1). Nous n'avons pas eu, dans nos tentatives, beaucoup plus de succès qu'eux.

Comme pour le bacille de Hansen, on obtient assez facilement une multiplication dans les tissus qui contiennent déjà des germes, mais il est impossible de transporter cette culture sur un autre milieu, ou même sur un fragment sain du même tissu. Si on enlève aseptiquement un ganglion inguinal chez un rat qui est au début de l'infection et qu'on le porte sur un culot de gélose nutritive, il se fait dans ce ganglion, en quelques semaines, une véritable culture. Le nombre des bacilles acido-résistants y croît dans des proportions colossales; il est facile de s'en rendre compte en coupant ce ganglion, ainsi qu'un autre du même rat, fixé au moment de l'extirpation. Dans le témoin, quelques rares cellules renferment des amas de bacilles acido-résistants. Ces cellules disséminées ne sont pas réunies en foyers compacts. Deux, trois cellules par place forment les groupes les plus considérables. Des coupes entières ne contiennent pas de microbes.

Dans le ganglion placé à l'étuve à 37 degrés, les germes se sont abondamment multipliés. Il est difficile de dire si cette multiplication s'est faite dans la cellule ou dans les espaces intercellulaires, car la plupart des éléments cellulaires sont autolysés. Les bacilles se sont, en réalité, développés dans le proto-

(1) Bayon, au contraire, l'aurait cultivé assez facilement. *Transac. Soc. of Trop. med.*, t. V, nº 5, p. 166.

plasma fusionné par disparition des membranes d'enveloppe. En tout cas, la comparaison des deux ganglions prouve qu'il s'agit ici d'une véritable culture et non point d'amas rassemblés après destruction du tissu. Entre les noyaux, on voit serpenter des chaînes de bacilles acido-résistants, constituées par des filaments beaucoup plus longs que le diamètre d'une et même de plusieurs cellules. Ces chaînes de 2, 3, 4 ou 5 files de bacilles placés bout à bout, se séparent parfois en Y et se rejoignent ensuite après avoir contourné un noyau. Il existe aussi, par places, des amas volumineux, de véritables colonies.

Ce phénomène a été observé à plusieurs reprises; il se produit, quelle que soit la nature du liquide contenu dans la gélose, dont l'unique rôle semble être de servir de support humide.

En portant un fragment de ganglion-culture sur un morceau de rate de rat stérilisée à 110 degrés et ayant subi un commencement de digestion par la trypsine, nous avons vu se former, au moins à la surface, de petites colonies microscopiques, chétives, et montrant peu de tendance à l'extension. Le transport de ces colonies sur nouvelle rate n'a pas été possible.

La culture commence assez vite, en moins de huit jours, et s'arrête rapidement. Au bout d'un mois et demi, les bacilles dégénèrent et deviennent granuleux. Ils sont morts, comme nous l'ont prouvé nos essais d'inoculations infructueux.

Le transport de la première culture en ganglion sur ganglion neuf, prélevé aseptiquement et non chauffé, sur fragment de rate recueilli dans les mêmes conditions, n'a donné lieu à aucun développement sur ces organes qui se sont montrés, en définitive, moins bons milieux que la rate chauffée à 110 degrés.

Le bacille dégénère en cultures impures. — La culture en milieu impur ayant donné, apparemment, à l'un de nous d'excellents résultats pour la multiplication en dehors de l'organisme du bacille de la lèpre humaine, il était indiqué d'appliquer le même procédé au germe de la lèpre du rat. Nos essais ont totalement échoué. Non seulement le bacille de Stefansky n'est pas favorisé par le voisinage d'autres germes,

mais il est rapidement submergé par eux. Il subit une lyse rapide. Des cultures mixtes inoculées après cinq et douze jours n'ont pas donné d'infection.

Il ne résiste pas à la dessiccation. — A défaut de cultures, la quantité énorme de bacilles qu'on peut recueillir sur certains animaux nous a permis de faire quelques recherches sur les propriétés de ce microbe et en particulier sur sa résistance à la dessiccation et à la chaleur. De 33 rats inoculés avec du matériel desséché sous le vide sulfurique, aucun ne s'est infecté. Chez 2 d'entre eux, on a trouvé, au point où on les avait mis et encore trois mois après l'inoculation, des bacilles granuleux qui, inoculés à d'autres animaux, n'ont donné lieu à aucune infection. Ils étaient donc morts.

Il ne supporte pas plus de 5 minutes un chauffage à 60 degrés. — Pour mesurer la résistance à la chaleur, nous avons introduit dans des tubes capillaires, fermés à la lampe aux deux bouts, un peu de matériel broyé en eau physiologique et très riche en acido-résistants.

Ces tubes ont été plongés dans un bain-marie à 60 degrés, les uns pendant 5 minutes, d'autres pendant 15 minutes, et les derniers pendant une demi-heure.

L'inoculation a été faite dès la sortie du bain-marie à des rats blancs.

Le matériel, chauffé 5 minutes, a infecté 4 rats sur 8; mais il est bon d'ajouter que les 4 premiers rats sont morts trop vite pour que chez eux la maladie ait eu le temps de se développer.

Les tubes chauffés plus longtemps n'ont provoqué aucun accident chez les rats qui les ont reçus.

Nous pouvons donc dire que le bacille de Stefansky résiste pendant 5 minutes à 60 degrés et qu'il meurt à la même température, quand on l'y maintient pendant un quart d'heure.

Conclusions.

1° A Paris, comme à Odessa, 5 p. 100 des rats d'égouts sont porteurs de bacilles de Stefansky. On ne trouve que 0,60 p. 100 de rats lépreux;

2° Les ganglions inguinaux sont en général les premiers pris;

3° Le poumon forme une sorte de filtre qui arrête les germes et les dirige vers les ganglions médiastinaux;

4° Le dépôt des germes sur des scarifications de l'épiderme ou simplement sur la peau épilée donne plus sûrement une infection aux rats d'expérience que l'inoculation sous-cutanée;

5° La peau intacte, même celle encore glabre, de petits rats de quelques jours s'oppose à la pénétration des microbes;

6° La lèpre de Stefansky est une maladie spécifique du rat. Les souris peuvent être infectées, mais moins facilement que les rats. L'infection par la peau épilée ou scarifiée manque plus souvent que l'inoculation sous-cutanée. On trouve chez elles des formes d'involution de bacilles comparables à celles qu'on rencontre chez les rats inoculés de lèpre humaine;

7° Le bacille de Stefansky, *Mycobacterium lepræ murium*, comme celui de Hansen, est un parasite des cellules mésodermiques. Il ne vit pas aux dépens de la cellule hôte, mais des mêmes substances qu'elle;

8° Les bacilles granuleux sont morts;

9° Une première culture est relativement facile à obtenir. La difficulté commence quand on veut la repiquer;

10° Le bacille succombe rapidement en milieu impur:

11° Il ne résiste pas à la dessiccation.

RECHERCHES
SUR LA LYMPHANGITE ÉPIZOOTIQUE EN ALGÉRIE

par J. BRIDRÉ, L. NÈGRE et G. TROUETTE

(Institut Pasteur d'Algérie.)

(Avec la Pl. XVII.)

Nos recherches ont eu pour but d'éclaircir l'étiologie et la pathogénie encore obscures de la maladie, d'établir la nature de son agent spécifique et de trouver un traitement efficace.

Malgré le travail de plusieurs années, nous n'avons pu réaliser, jusqu'à présent, qu'une faible partie de notre programme. Nous nous contenterons d'exposer ici nos observations et nos expériences, en cherchant à tirer des résultats obtenus les conclusions qu'ils comportent.

L'étude clinique fournit des renseignements précieux et, sans nous étendre sur la description déjà faite dans maints ouvrages des symptômes de la lymphangite épizootique, nous commencerons ce mémoire par un tableau succinct de la maladie telle que nous l'avons observée en Algérie.

Parmi les nombreuses dénominations qui servent à désigner la *Lymphangite épizootique*, celle de *Farcin d'Afrique* et, depuis le décret du 4 août 1907, qui en fait une maladie contagieuse légale, celle de *Lymphangite farcinoïde*, sont le plus fréquemment employées en Algérie (1).

C'est une affection suppurante et ulcéreuse, déterminée par la présence d'un parasite spécifique, *Cryptococcus farciminosus* de Rivolta.

Elle atteint souvent le cheval, plus rarement le mulet : nous ne l'avons jamais constatée chez l'âne dans les conditions naturelles, ni chez le bœuf.

(1) Les Arabes l'appellent « bou sebh'a », le père du chapelet.

On l'observe surtout dans la région du littoral, particulièrement sur les animaux des camionneurs et des jardiniers.

Début. Symptômes. — Il semble qu'une plaie préexistante sert toujours de porte d'entrée à la maladie. L'incubation n'est indiquée par l'apparition d'aucun phénomène morbide et, même à sa période d'état, la maladie ne paraît avoir aucun retentissement sur la santé générale. La plaie infectée n'a aucune tendance à la cicatrisation ; elle reste ulcéreuse, s'étend lentement en largeur tandis que ses bords s'épaississent, bourgeonnent et se renversent en forme de « cul-de-poule ». La périphérie, légèrement œdématiée, devient douloureuse.

Après un laps de temps variant de huit jours à deux mois, surviennent les accidents locaux, parfois bruyants, le plus souvent insidieux : boutons, cordes, tumeurs, engorgements. Tantôt les boutons apparaissent les premiers, tantôt les cordes les précèdent; parfois, surtout dans les régions basses du tronc, un engorgement volumineux est d'abord seul appréciable.

Ces diverses manifestations symptomatiques sont *toujours douloureuses* à la pression.

Les *boutons* ont communément la grosseur d'une noisette. Ils évoluent à la façon d'un abcès banal dont ne les différencie pas le pus auquel ils donnent écoulement. Ouverts, ils ont l'aspect en cul-de-poule et l'atonie de la plaie initiale. On les observe sur le trajet des lymphatiques qui, si l'angioleucite ne les a pas envahis les premiers, s'épaississent, s'indurent, deviennent les *cordes farcineuses* dont le diamètre varie de 1 à 5 centimètres.

Ces *cordes* sont dures, noueuses, chaudes, douloureuses. Leur progression est toujours centripète. Parties, le plus souvent, des régions inférieures des membres, elles gagnent rapidement la pointe de l'épaule, l'entrée de la poitrine, l'aine et, provoquent parfois des tuméfactions énormes des ganglions pré-pectoraux, pré-scapulaires ou inguinaux.

L'ouverture des tumeurs ganglionnaires donne écoulement à une sérosité citrine, au début, et, plus tard, à du pus jaune provenant de multiples abcès creusés en galeries dans le tissu de néoformation, abcès qui, parfois, se collectent et atteignent alors le volume du poing.

Les *engorgements* s'observent dans les régions basses des membres ou à la face inférieure du tronc. Sur les membres, ils suivent généralement l'apparition des cordes et des boutons : ils sont froids, durs, presque indolores, souvent énormes et couverts de bourgeons saillants, blafards, mollasses. Les engorgements de la face inférieure du tronc sont, au contraire, chauds, douloureux ; ils ne présentent que de rares boutons caractéristiques et le trajet des cordes noyées dans la masse est difficilement perceptible.

Des accidents, boutons et cordes, peuvent également se montrer sur les muqueuses oculaire, pituitaire et labiale. Nous avons observé sur le corps clignotant d'un cheval atteint à la face, un bouton spécifique relié par une traînée lymphatique à une corde voisine qui aboutissait aux ganglions sous-glossiens.

Deux animaux (un mulet et un cheval) ont présenté avec des symptômes de lymphangite, des ulcères de la pituitaire de 0 m. 01 de diamètre, arrondis, à bords grisâtres, dont le fond était recouvert de fins bourgeons charnus : ces lésions simulaient, à s'y méprendre, le chancre morveux et le diagnostic différentiel ne put être établi qu'à l'aide de la malléine (1). Des faits semblables ont déjà été signalés par différents auteurs : Nocard (2), Pricolo (3).

Sur la muqueuse labiale, dans les lymphangites de la face, les accidents ne sont point rares et présentent, comme caractères particuliers, des boutons nombreux, rapprochés, du volume d'un pois.

Nous devons citer encore une forme peu commune de lymphangite se traduisant par des boutons répartis sur tout le corps et non reliés entre eux par des traînées lymphatiques apparentes. Enfin, nous avons observé deux fois des lésions testiculaires.

(1) La malléination de tous les chevaux atteints de lymphangite est obligatoire, en Algérie ; elle nous a permis de constater plusieurs fois la coexistence de la morve et de la lymphangite épizootique. A l'autopsie d'un cheval morveux nous avons trouvé de petits abcès pulmonaires renfermant des cryptocoques.

(2) Nocard, Sur le diagnostic de la lymphangite épizootique. *Bull. de la Soc. centr. de médecine vétérinaire*, 1891.

(3) Pricolo, Contribution à l'étude de la lymphangite épizootique. *Revue générale de méd. vétér.*, 1907, p. 457.

Marche. — La marche de la maladie est tantôt rapide, tantôt lente. Nous l'avons vue évoluer dans l'espace de huit jours : à la suite d'une blessure du jarret occasionnée par un coup de fourche, toute la région de la saphène fut occupée par une corde moniliforme, pathognomonique. Nous l'avons vue aussi progresser avec une extrême lenteur et mettre environ quarante jours pour arriver de la plaie initiale, située au-dessus du genou, au ganglion pré-pectoral (1).

Pronostic. — La lymphangite farcinoïde est une affection grave en raison de sa fréquence, de sa ténacité, de sa contagiosité, de la longue indisponibilité qu'elle entraîne et des soins dispendieux que nécessite son traitement chirurgical.

Elle est moins grave sur les chevaux de sang que sur les animaux à tempérament lymphatique. Les mulets arabes guérissent plus facilement que les mulets français.

L'âge et le siège de la lésion initiale, la forme des accidents peuvent fournir d'utiles indications sur la gravité de l'affection.

L'excision hâtive du cordon peut amener la guérison en quinze jours.

Si au contraire on attend, pour intervenir, que les cordes se multiplient, que des engorgements volumineux s'établissent, la maladie peut devenir incurable.

Quand la plaie d'entrée se trouve située sur les faces latérales du pâturon ou du boulet (2), qu'elle s'accompagne d'un engorgement rapide et douloureux du canon, on a affaire à une lymphangite tenace.

Si le cryptocoque pénètre par effraction au-dessus du genou ou du jarret, l'affection est généralement bénigne et aisément curable. Il en est de même des lésions de la tête et de l'encolure.

(1) Ces faits ont une grande importance au point de vue judiciaire : en cas de litige portant sur la vente d'animaux lymphangiteux, il est impossible de déterminer, dans la plupart des cas, la date de l'infection avec assez de certitude pour permettre à un tribunal de trancher le différend en toute équité.

(2) Nous n'avons jamais vu les plaies de la région antérieure du boulet ou du pâturon servir de porte d'entrée à la lymphangite épizootique. Ces plaies résultant d'une glissade au moment du démarrage sont cependant très communes chez les chevaux de rouliers et camionneurs.

Celles du thorax présentent un caractère particulier de gravité lorsque les cordes sont dirigées parallèlement aux côtes.

On peut considérer la guérison comme prochaine et parfaite lorsque le symptôme douleur disparaît. Toutes les fois que nous l'avons vu persister sur des animaux en apparence guéris, une rechute locale ne tardait pas à survenir.

Après guérison, l'affection ne laisse pas les animaux inutilisables malgré la persistance des engorgements du canon et des reliquats cicatriciels.

Nous n'avons jamais constaté de récidive, même lorsque les animaux guéris étaient longtemps maintenus au contact des malades.

Répartition des localisations.

Membre antérieur droit	110	
— — gauche	109	233
Les deux membres antérieurs	14	
Membre postérieur droit	28	
— — gauche	39	71
Les deux membres postérieurs	4	
Epaules	8	
Tronc	34	
Encolure	9	57
Tête	6	
Généralisation	3	3
Total		364

Au point de vue de la *gravité de la maladie*, les 364 malades doivent être ainsi répartis :

32 ont été abattus comme incurables après une ou deux opérations ;
21 ont été abattus sans opération ;
1 a guéri sans intervention ;
310 ont été guéris après opération ou traitement.

Fréquence de la maladie suivant les écuries — Les 364 lymphangiteux appartenaient à 97 écuries renfermant un total de 1.168 animaux. Mais certaines écuries ont été particulièrement frappées ainsi :

Une	écurie	de 180	chevaux	ou mulets	a eu	20	malades.
—	—	65	—	—	a eu	8	—
—	—	50	—	—	a eu	11	—
—	—	82	—	—	a eu	27	—
—	—	12	—	—	a eu	7	—

Total : 389 chevaux ou mulets. . . . . 73 malades.

Soit : 18,76 p. 100.

Le pourcentage des malades (364) par rapport à l'effectif total (1.168) des écuries atteintes serait encore plus élevé si l'on tenait compte des nombreuses écuries ne renfermant qu'un ou deux animaux.

FRÉQUENCE DE LA MALADIE SUIVANT LES SAISONS.
(*Répartition annuelle et mensuelle.*)

	1909	1910	1911	TOTAUX	MOYENNES
Janvier . .	10	12	14	36	12 »
Février . .	12	13	12	37	12.33
Mars. . . .	14	13	13	40	13.33
Avril. . . .	15	12	15	42	14 »
Mai	8	11	11	30	10 »
Juin	8	5	6	19	6,33
Juillet . . .	1	5	6	12	4 »
Août. . . .	4	3	6	13	4.33
Septembre.	4	13	7	24	8 »
Octobre . .	9	12	7	28	9.33
Novembre .	10	15	13	38	13.66
Décembre .	12	17	16	45	15 »
	107	131	125	364	

Les chiffres qui figurent dans ce tableau représentent les cas de lymphangite épizootique signalés au service vétérinaire, sanitaire, dans la 1re circonscription (ville d'Alger). Ils nous révèlent que la lymphangite épizootique a l'allure d'une affection saisonnière : rare pendant la période chaude et sèche — mai à octobre — plus commune pendant la saison froide et pluvieuse — novembre à avril.

Anatomie pathologique. — Le simple examen macroscopique d'une *corde* excisée montre que cette corde est constituée par

du tissu fibreux entourant un canal lymphatique dont les parois épaissies se confondent avec le tissu néoformé. Si on fait glisser le doigt le long du cordon, on perçoit, de place en place, de petites nodosités de volume variable et dont le contenu a un aspect différent suivant que la nodosité est très petite et récente ou qu'elle est volumineuse et sans doute plus ancienne. Dans le premier cas, le contenu est épais, *gris rosé*; dans le second, son aspect se rapproche d'autant plus de celui du pus que la lésion a pris de plus grandes proportions.

Le microscope nous renseigne sur la cause de ces variations de caractères.

Si on examine à l'état frais le contenu gris rosé d'une nodosité de faible dimension — de la grosseur d'un gros grain de plomb à celle d'un petit pois — on a l'impression de voir une véritable colonie de cryptocoques. Parmi un amas de parasites où les formes de bourgeonnement sont nombreuses, à peine trouve-t-on quelques rares leucocytes.

L'examen microscopique du contenu des nodosités plus volumineuses montre, au contraire, que les leucocytes ont envahi la « colonie »; les formes de bourgeonnement existent encore, mais en moins grande abondance. Un certain nombre de parasites sont phagocytés. L'organisme a mis en œuvre ses moyens de défense. Plus la lésion est volumineuse, plus les leucocytes sont nombreux et plus la phagocytose est intense.

La coloration des frottis de ces produits permet de faire les mêmes constatations (pl. XVII, fig. 3 et 4). Le cryptocoque se colore assez difficilement par les méthodes ordinaires; il prend le gram, mais un grand nombre d'éléments restent incolores, lorsqu'on suit la technique usuelle. La méthode de Claudius donne d'excellents résultats : il faut prolonger pendant une heure et plus le contact avec le violet de gentiane et avec la solution d'acide picrique et bien décolorer ensuite au chloroforme : le parasite apparaît alors en bleu violet. La méthode de Dominici au bleu de toluidine et la coloration de Giemsa, avec différenciation au tannin, fournissent aussi de bons résultats.

Les coupes histologiques d'un cordon lymphatique à petits nodules offrent également un certain intérêt.

La coloration de Claudius montre chaque nodule formé par

une colonie de cryptocoques. Les parasites ont envahi tout le trajet lymphatique et un certain nombre d'éléments apparaissent libres entre les cellules conjonctives du tissu de réaction (pl. XVII, fig. 1 et 2).

Ces observations établissent que *le cryptocoque n'est pas un parasite des leucocytes* et que sa présence dans les globules blancs n'est qu'un phénomène de phagocytose.

Les auteurs qui ont fait du cryptocoque un protozoaire parasite des leucocytes ont effectué leurs prélèvements dans des foyers purulents où la phagocytose est active. Ducloux a prélevé les produits qu'il a étudiés « par ponction de boutons arrivés à maturité et par raclage de bourgeons charnus recouvrant le fond de plaies ulcéreuses ».

Si ces auteurs avaient étudié les lésions jeunes d'un cordon excisé, ils auraient sans doute conclu différemment (1).

La lymphangite épizootique ne peut être considérée que comme une maladie, d'abord locale, qui s'étend vers le centre en suivant rigoureusement le trajet des lymphatiques. Les ganglions de l'entrée du thorax ou de l'abdomen arrêtent le plus souvent les cryptocoques dans leur marche centripète, et il est exceptionnel que les parasites franchissent cette barrière et occasionnent des lésions des organes internes.

Le parasite. — Sa nature.

Le parasite, découvert par Rivolta, en 1873, étudié par Rivolta et Micellone et désigné sous le nom de *Cryptococcus farciminosus*, a été retrouvé par les différents auteurs qui se sont occupés de la lymphangite épizootique. Il est unanimement considéré comme l'agent spécifique de cette maladie. En revanche, sa nature même est très controversée. On en a fait tour à tour une coccidie (Canalis), un sporozoaire (Piana, Galli-Valerio), un blastomycète (Fermi et Arusch, Nocard, Tokishige, Marcone, Baruchello, Sanfelice, Pricolo, etc.), et

(1) Lorsque, sur l'animal vivant, un nodule devient perceptible au toucher, il est déjà envahi par les leucocytes et la phagocytose a commencé.

cette dernière opinion était généralement admise lorsque, dans ces dernières années, Gasperini (1), ayant repris l'étude du cryptocoque, a fait du parasite une coccidie qu'il a baptisée *Lymphosporidium equi*. Puis, Ducloux (2), considérant le cryptocoque comme un parasite des leucocytes, le rapproche des *Leishmania* et l'appelle *Leucocytozoon piroplasmoïdes*. Les auteurs se trouvent ainsi partagés en deux camps : les uns persistent à voir dans le parasite de Rivolta un blastomycète ; les autres adoptent les idées de Gasperini ou de Ducloux et en font un protozoaire [N. Mori (3), Thiroux et Teppaz (4)].

Le cryptocoque de Rivolta a été si souvent décrit qu'il serait inutile de revenir sur sa morphologie, si des descriptions récentes ne tendaient à le rapprocher de certains protozoaires connus.

Thiroux et Teppaz, notamment, s'expriment ainsi :

« Les frottis obtenus par ponction des tumeurs *non ouvertes* ont été colorés par la méthode de Laveran. On y retrouve, soit libres, soit contenus dans les leucocytes mono ou polynucléaires ou dans les grands macrophages, de petits corps sphériques ou ovoïdes de 3 à 5 μ de diamètre, semblables au parasite du bouton d'Orient de l'homme et n'en différant que parce qu'ils ne présentent qu'un gros karyosome et pas de micronucleus apparent. »

L'absence de micronucleus apparent marque déjà une différence appréciable entre le *Lymphosporidium* de Gasperini

(1) G. Gasperini, Ulteriori ricerche sulla etiologica protozoaria della linfangite epizootica equina. *Acc. med. fisica Fiorentina*, séance du 13 février 1908; *Lo Speriment.*, t. LXII, f. I-II. janvier-avril 1908, 7 pages.

— La linfangite protozoaria ed il suo agente specifico Lymphosporidium equi. *Acc. med. fis. Fiorent.*, séance du 14 mai 1908, *ib.*; f. III, mai-juin 1908, 31 pages.

— La linfangite protozoaria equina ed il suo Lymphosporidium secondo le più recenti ricerche. *Sperimentale Arch. di Biol. norm. e patol.* Fasc. II, mars-avril 1909.

(2) Ducloux, Sur un protozoaire dans la lymphangite épizootique du mulet en Tunisie. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXIV, n° 13, séance du 4 avril 1908, p. 593.

(3) N. Mori, Osservazioni sul cosidetto farcino criptococcico, linfangite epizootica o saccaromicosi equina. *La Clinica vétér.*, f. 4 et 5, 1908, 14 pages.

(4) A. Thiroux et L. Teppaz, Contribution à l'étude de la lymphangite épizootique des équidés au Sénégal. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXIII, 1909, pp. 420-425.

ou le *Leucocytozoon* de Ducloux et le parasite du bouton d'Orient; mais ce n'est pas la seule; lorsqu'on examine une préparation colorée d'un produit pathologique renfermant une *Leishmania*, on trouve les parasites inclus dans les mononucléaires; ces parasites affectent la forme d'une poire plus ou moins renflée et présentent un karyosome et un micronucleus très nets colorés en violet rouge par le Giemsa. Le protoplasma est bleu pâle et la membrane d'enveloppe presque imperceptible.

Dans une préparation de pus à cryptocoques, on voit ces parasites libres ou inclus généralement dans les polynucléaires. Ils présentent une forme ovale ou elliptique avec une partie colorée en rouge violet par le Giemsa et le reste en bleu. La membrane d'enveloppe, quelquefois moins nette chez les parasites intraleucocytaires que chez les cryptocoques libres, est toujours apparente.

En somme, les deux parasites diffèrent par leur forme, leur constitution, leur habitat, et nous ne pouvons suivre Thiroux et Teppaz dans leur conclusion « que la présence d'un karyosome net et l'élection tinctoriale obtenue par le mélange éosine-bleu ne permettent pas de conserver le moindre doute sur la nature de ce protozoaire ».

Plus loin, les mêmes auteurs écrivent : « On peut voir aussi le double contour caractéristique de l'ancien cryptocoque; cependant, il s'observe moins souvent sur les parasites endoleucocytaires et on le retrouve surtout sur les parasites libres ou contenus dans des débris de leucocytes. Nous pensons que ce n'est qu'un artifice de préparation, dû à une dessiccation inégale. »

De même, « l'aspect en petit citron serait dû à la dessiccation » ! !

Mais, à l'état frais, *cette membrane d'enveloppe*, *épaisse*, *réfringente*, *accusée par un double contour*, *existe*, *sans artifice de préparation*, *et les formes en citron ne sont pas rares*; point n'est besoin de dessiccation pour les faire apparaître!

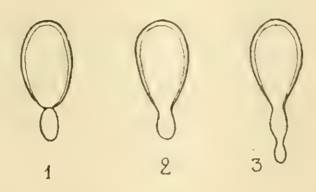
Enfin, les formes considérées généralement comme formes de bourgeonnement résulteraient, pour les partisans du parasite protozoaire, de « l'accolement de deux individus ».

Or, si certaines formes peuvent être diversement interpré-

tées, lorsque la cellule fille possède déjà sa membrane d'enveloppe (fig. 1), d'autres représentent indiscutablement des formes de reproduction : ce sont celles où la membrane réfringente n'existe plus entre la cellule mère et la cellule fille, celle-ci formant hernie à travers l'enveloppe de celle-là (fig. 2).

Ces formes sont particulièrement abondantes dans le contenu des lésions jeunes dont nous avons parlé plus haut (pl. XVII, fig. 3 et 4). On observe même, dans un tel produit, des bourgeons de deuxième génération (fig. 3).

Gasperini avait abandonné l'hypothèse levure à cause des



insuccès des cultures (si une levure poussait, elle ne reproduisait pas la maladie), à cause aussi de la résistance extraordinaire du germe, de ses caractères de structure et de multiplication. Cet auteur reconnaît parmi les granulations de l'intérieur du parasite (kyste de protozoaire) des mérozoïtes, des microgamètes pluriflagellés mobiles, des macrogamètes.

On distingue, en effet, à l'état frais, des granulations de forme variable. Souvent, on n'aperçoit dans l'élément ovale qu'un petit corps sphérique animé d'un mouvement brownien. Quelquefois, on voit plusieurs corps ronds ou plus ou moins allongés, immobiles. Que représentent ces corps? Les granulations des levures facilement cultivables ont été l'objet de tant de controverses qu'on nous pardonnera de ne pas exprimer d'opinion sur celles du cryptocoque. Nous nous bornerons de même à mentionner, sans les interpréter, les grandes formes observées déjà par d'autres auteurs.

L'insuccès des *cultures* a été la principale objection émise contre la nature blastomycétienne du parasite. Si différents auteurs disent avoir obtenu des cultures sur divers milieux, un grand nombre d'autres n'ont eu que des échecs, et on peut se demander pourquoi Marcone, Tokishige, Sanfelice, etc., ont

réussi à cultiver le cryptocoque, alors que les tentatives faites dans les mêmes conditions de température, sur les mêmes milieux, n'ont pas donné de résultats aux autres chercheurs.

Nous avons, nous-mêmes, fait de nombreux essais. Nous avons ensemencé, sur milieux animaux (sérum, sang, lymphe, extrait de cordon lymphatique malade, etc.) ou sur milieux végétaux (pomme de terre, carotte, foin, paille, caroube, etc.) glycérinés, sucrés, milieux liquides ou solides, en présence ou à l'abri de l'air, les produits recueillis, soit dans les lésions jeunes, soit dans les abcès mûrs et fermés; nous avons même lavé les parasites avant l'ensemencement pour les débarrasser d'hypothétiques substances pouvant nuire à leur développement *in vitro*. Nous n'avons jamais obtenu de cultures nettes. Peut-être avons-nous eu un début de développement dans certains milieux végétaux où nous avons cru constater un nombre beaucoup plus grand de formes de bourgeonnement qu'au moment de l'ensemencement; mais les réensemencements n'ont jamais rien donné.

Nos tentatives de cultures n'ont cependant pas toujours été stériles; nous avons vu plusieurs fois se développer des colonies de levures. Une de ces colonies, dont les éléments présentaient une ressemblance frappante avec le cryptocoque, eût pu nous faire illusion sur son origine, si l'un de nous n'avait antérieurement fait la constatation suivante : un tube de gélose au foin ensemencé par une simple strie médiane et laissé à la température du laboratoire présentait, au bout d'une quinzaine de jours, une petite colonie d'une levure rappelant assez bien le cryptocoque sans l'enveloppe à double contour; un examen à la loupe montra que la colonie s'était développée à côté de la strie d'ensemencement! Il s'agissait, sans doute, dans ces différents cas, de levures de l'air, et leur inoculation à des mulets resta sans résultat.

Cela ne veut pas dire que tous les auteurs qui ont cru cultiver le cryptocoque n'aient cultivé qu'une levure étrangère. Il faut tenir compte, surtout, de l'expérience de J. Sanfelice, qui dit avoir inoculé avec succès, à un mulet, une culture pure de quatrième génération. Rien n'autorise à contester cette expérience. Il se peut que, dans certaines conditions, indéterminées jusqu'à présent, le cryptocoque soit cultivable. Les insuccès

obtenus avec les ensemencements de pus peuvent s'expliquer par la faible quantité, dans ce produit, de parasites vivants. Mais les ensemencements pratiqués avec le contenu des petites nodosités du trajet lymphatique, où le grand nombre de formes de bourgeonnement témoigne de l'activité du cryptocoque, devraient, semble-t-il, donner des résultats positifs. Il n'en est rien, cependant, et toutes les conditions de la culture, si culture il y a, restent à fixer.

En admettant même l'impossibilité absolue de cultiver le cryptocoque, il n'y a pas lieu d'en faire pour cela un protozoaire. Il est à remarquer que, précisément, les protozoaires dont on a voulu le rapprocher, les *Leishmania*, se cultivent aisément; or, personne, jusqu'à présent, n'a annoncé la culture du parasite de Rivolta dans les milieux spéciaux. Nous avons nous-mêmes essayé, à maintes reprises, la culture sur milieu Novy-Neal-Nicolle sans plus de succès que sur les milieux à levures. En réalité, comme l'a fait observer déjà Panisset (1), l'insuccès des essais de cultures ne saurait être invoqué en faveur de l'une ou de l'autre manière de voir.

Les observations que nous avons exposées jusqu'ici, tant sur l'habitat que sur la morphologie et le mode de reproduction du parasite tendaient à nous le faire considérer comme une levure.

Ne pouvant arriver à renouveler l'expérience de Sanfelice, nous avons pensé que la méthode de déviation du complément pourrait apporter dans cette discussion un aperçu nouveau (2).

I. — Nous avons d'abord recherché la sensibilisatrice dans le sérum d'animaux atteints de lymphangite épizootique, en employant comme antigène une dilution de cryptocoques dans l'eau physiologique.

(1) L. Panisset, La place zoologique du parasite de la lymphangite épizootique d'après quelques travaux récents. *Revue gén. méd. vét.*, 1er avril 1910, p. 378, 384.

(2) *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, séances du 18 avril et du 17 mai 1910.

(Une « colonie » de la grosseur d'un petit pois, prise sur le trajet d'un cordon excisé, fut émulsionnée dans 8 c.c. environ d'eau physiologique.)

Voici le protocole de l'expérience (l'alexine étant titrée, nous avons fait varier la dose d'antigène) :

EAU physiologique.	SÉRUM chauffé d'animal à lymphangite épizootique (mulet).	ANTIGÈNE	ALEXINE (sérum de cobaye au 1/10).	APRÈS 1 HEURE à l'étuve à 36°, on ajoute :	RÉSULTATS après 20 minutes à l'étuve.
1,2	0,5	0.1	0,2	Sérum de cheval antichèvre et globules de chèvre.	Très légère hémolyse (l'antigène était en quantité insuffisante).
1,2	0,5	0,2	0,2		Pas d'hémolyse.
1 »	0,5	0,3	0,2		Pas d'hémolyse.
1,7		0,1	0,2	Id.	Hémolyse.
1,6		0.2	0,2		
1,5		0.3	0,2		
1,3	0,5		0,2	Id.	Hémolyse.
1,3	0,5		0,2		
1,3	0,5		0,2		

Même expérience avec sérum normal d'âne : hémolyse dans tous les tubes.

Conclusion. — Le sérum d'animal atteint de lymphangite épizootique renferme une sensibilisatrice pour le cryptocoque.

II. — Si le cryptocoque est une levure, peut-être arriverait-on à des résultats identiques à ceux de l'expérience ci-dessus en employant comme antigène une culture de blastomycète connu.

Nous nous sommes servis d'une levure de riz (1) cultivée sur gélose et émulsionnée dans l'eau physiologique, autant que possible, dans les mêmes proportions que le cryptocoque dans l'expérience précédente. Puis, nous avons répété l'expérience en nous servant de levure de bière et de levure de raisin.

Les doses de sérum, d'antigène et d'alexine étaient exactement les mêmes que dans l'expérience I.

Résultats. — 1° Avec le sérum d'animal malade, pas d'hémolyse dans les trois premiers tubes; hémolyse dans les tubes témoins.

2° Avec le sérum normal, hémolyse partout.

(1) Levure fermentant à haute température, isolée en Indo-Chine, par M. le Dr Calmette.

Conclusion. — La sensibilisatrice du sérum d'un animal à lymphangite épizootique manifeste son action en présence d'une levure.

Nous avons renouvelé les expériences ci-dessus en nous servant de sérum de cheval malade et de sérum normal de cheval.

L'antigène était soit le cryptocoque, soit la levure.

Comme le montre le protocole de l'expérience, nous avons fait agir les sérums en présence d'une dose fixe d'antigène et d'une dose variable d'alexine.

EAU physiologique.	SÉRUM chauffé d'animal à lymphangite épizootique (cheval).	ANTIGÈNE (cryptocoque ou levure).	ALEXINE	APRÈS 1 HEURE à l'étuve à 37 degrés, on ajoute :	RÉSULTATS après 30 minutes à l'étuve.
1,1	0,5	0,3	0.1	Sérum de cheval antichèvre et globules de chèvre.	Pas d'hémolyse.
1 »	0,5	0,3	0,2		Pas d'hémolyse.
1.6		0.3	0,1	Id.	Hémolyse.
1.5		0,3	0.2		
1.4	0.5		0.1	Id.	Hémolyse.
1.3	0,5		0.2		

Avec le sérum normal de cheval, hémolyse partout.

D'après ce tableau, on peut voir que ces nouvelles expériences ont confirmé pleinement les résultats des premières.

III. — Il fallait voir ensuite si un microbe quelconque, le *Bact. coli*, par exemple, ne pouvait agir, comme le cryptocoque et la levure, en présence de la sensibilisatrice.

Mêmes doses que ci-dessus en employant comme antigène une émulsion de *B. coli* cultivé sur gélose.

Le résultat est négatif : il y a hémolyse dans tous les tubes.

IV. — Il restait à voir si le cryptocoque ou la levure n'étaient pas capable de fixer une autre sensibilisatrice que celle du sérum d'animal à lymphangite.

Nous avons fait agir, toujours aux mêmes doses, du sérum antipesteux en présence d'émulsions de cryptocoque et de levure.

Résultat négatif : hémolyse partout.

V. — Nous avons tenté une contre-épreuve des expériences précédentes en faisant agir sur les différents antigènes, levure de bière, levure de raisin, cryptocoque, un sérum antilevure, en l'espèce, sérum de lapin ayant reçu à plusieurs reprises, sous la peau et dans le péritoine, de la levure de bière.

Ces expériences ont été répétées avec un sérum normal de lapin et en suivant toujours le même protocole.

Résultats. — Dans toutes les expériences faites avec le sérum antilevure de bière, que l'antigène soit la levure de bière, la levure de raisin ou le cryptocoque, les résultats sont les mêmes : déviation du complément dans les tubes renfermant le sérum antilevure et les différents antigènes, hémolyse dans les tubes témoins.

Avec le sérum normal, hémolyse partout.

IV. — Nous avons enfin complété ces expériences en examinant l'action du sérum d'animal à lymphangite épizootique sur la *Leishmania infantum* (parasite dont on a voulu rapprocher celui de la lymphangite épizootique), et sur un autre protozoaire, le *Trypanosoma vespertilionis*. L'antigène était constitué par des cultures des protozoaires en milieu Novy-Neal-Nicolle (liquide de condensation de la culture dilué par moitié dans l'eau physiologique).

Même réaction avec le sérum normal.

Toujours même protocole. Nous avons fait des tubes témoins avec le cryptocoque comme antigène.

Résultats. — Il y a déviation dans les tubes témoins (antigène, cryptocoque et sérum de lymphangite) et hémolyse dans les autres tubes.

La sensibilisatrice du sérum des animaux à lymphangite épizootique ne manifeste pas son action en présence de protozoaires tels que *Leishmania infantum* et *Trypanosoma vespertilionis*.

Conclusions.

I. — Le sérum des animaux atteints de lymphangite épizootique renferme une sensibilisatrice.

II. — Cette sensibilisatrice manifeste son action aussi bien en présence d'une levure qu'en présence du parasite spécifique.

III. — Un autre microbe tel que le *B. coli* n'est pas sensibilisé par le sérum d'animal à lymphangite épizootique.

IV. — Ni la levure ni le cryptocoque ne sont sensibilisés par un sérum antimicrobien tel que le sérum antipesteux.

V. — La sensibilisatrice d'un sérum d'animal préparé avec la levure de bière n'est pas rigoureusement spécifique pour cette levure; elle manifeste également son action sur une autre levure telle qu'une levure de raisin.

VI. — Un sérum antilevure dévie le complément, aussi bien en présence du parasite de la lymphangite épizootique qu'en présence d'une levure quelconque.

VII. — La sensibilisatrice du sérum des animaux à lymphangite épizootique ne manifeste pas son action en présence de protozoaires tels que *Leishmania infantum* et *Trypanosoma vespertilionis*.

Puisque : 1° *le sérum d'animal à lymphangite épizootique* dévie le complément en présence des levures comme en présence du cryptocoque, et que ce sérum ne dévie pas le complément en présence d'autres microbes ou en présence de protozoaires; 2° qu'un *sérum antilevure* dévie le complément aussi bien en présence d'une levure autre que celle qui a servi à le produire qu'en présence de celle-ci, et que ce même sérum dévie le complément en présence du parasite de la lymphangite épizootique comme en présence des levures; il résulte que, dans ces diverses expériences, *le sérum d'animal à lymphangite épizootique se comporte comme un sérum antilevure, et le parasite de la lymphangite épizootique comme une levure.*

Ces faits expérimentaux semblent, sinon démontrer, du moins étayer fortement l'hypothèse de la nature blastomycétienne du parasite de la lymphangite épizootique.

En résumé, les partisans du parasite protozoaire basent leur opinion sur l'insuccès des cultures, sur une ressemblance avec certains protozoaires et sur l'habitat du parasite qu'ils trouvent le plus souvent à l'intérieur des leucocytes.

Nous avons vu que l'insuccès des cultures ne peut être invoqué, que le cryptocoque n'a qu'une ressemblance lointaine avec les *Leishmania*, et nous croyons avoir démontré que l'agent de la lymphangite épizootique n'est pas un parasite des leucocytes.

On peut dire, au contraire, que la ressemblance du cryptocoque avec certaines levures est frappante, par sa forme même, par ses caractères de coloration, par son mode de reproduction par bourgeonnement. Enfin, les résultats de nos expériences de déviation du complément constituent de sérieux arguments en faveur du parasite levure, et nous nous rangeons parmi les auteurs qui considèrent le parasite de Rivolta comme un blastomycète.

Étiologie.

La fréquence de la lymphangite épizootique sur le littoral et à certaines époques de l'année, a amené certains auteurs à penser que la maladie pouvait être transmise par un insecte piqueur. Thiroux et Teppaz émettent cette opinion et tendent à accuser les moustiques. Cette manière de voir cadre assez bien avec l'hypothèse du protozoaire, qui passerait ainsi par un hôte intermédiaire, mais aucun fait d'observation ni aucune expérience ne sont venus la confirmer.

Ainsi que nous l'avons dit plus haut, il semble qu'une plaie préexistante sert toujours de porte d'entrée à la maladie. Il n'est pas impossible d'admettre que des insectes, les mouches par exemple, qui affectionnent les plaies, soient les vecteurs occasionnels du parasite et des agents de contagion. Mais nous avons pu constater que des instruments de pansage peuvent remplir le même office : une blessure faite, sur un cheval sain, par une tondeuse ayant servi à la toilette d'un lymphangiteux a été le point de départ de l'infection spécifique. La maladie peut d'ailleurs être transmise par inoculation de pus à cryptocoques. L'infection n'est pas réalisée à coup sûr : tantôt on obtient, après un temps variable, un abcès suivi d'une corde lymphatique et des lésions habituelles; tantôt l'inoculation est suivie d'un simple et unique abcès au point d'injection, tantôt même il n'y a aucune manifestation consécutive. Ces résultats

différents tiennent sans doute, d'une part, à la résistance variable des sujets d'expérience, et d'autre part, à la virulence du produit inoculé.

Un cas de contagion directe à l'homme a même été constaté : un vétérinaire s'est infecté par une plaie ouverte du pouce en opérant un cheval à lymphangite (1).

L'examen de la statistique rapportée plus haut montre que la maladie est surtout fréquente pendant la saison froide et pluvieuse. Malgré la période d'incubation quelquefois longue, ces constatations ne sont pas en faveur d'un rôle possible des moustiques. Thiroux et Teppaz ont remarqué que la contagion se manifeste surtout, au Sénégal, pendant la saison chaude et humide (hivernage).

Peut-être cette morbidité plus grande pendant les saisons humides est-elle due simplement à ce que la conservation du parasite dans le milieu extérieur est favorisée par l'humidité alors qu'elle se trouve compromise par la dessiccation. Mais ce n'est là qu'une simple hypothèse.

Essais de traitement.

L'intervention chirurgicale qui consiste à exciser la totalité des lésions au bistouri ou à les détruire par la cautérisation ignée, est le seul traitement de la lymphangite épizootique employé par les vétérinaires algériens. Si l'opération jouit d'une telle faveur malgré ses inconvénients multiples, — grands délabrements, interruption prolongée du travail, etc., c'est qu'elle seule, parmi les nombreux traitements essayés jusqu'à présent, montre une certaine efficacité. Efficacité relative, d'ailleurs et qui varie avec l'âge et le siège des lésions. La proportion de guérisons par excision du cordon lymphatique est d'environ 65 p. 100.

D'après Teppaz (2) qui, au Sénégal, a comparé l'action de différents médicaments, l'iodure de potassium en injections intraveineuses aurait, seul, donné des résultats appréciables.

(1) *Bull de la Soc. de path. exot.*, t. IV, 1911, p. 394. — J. Brault avait déjà signalé un cas de lymphangite épizootique chez l'homme. Janus, Harlem, 1910.

(2) L. Teppaz, Essais de traitement de la lymphangite épizootique du Sénégal. *Bull. Soc. path. exot.*, t. III, 1910, p. 450.

Mais le grand nombre d'injections nécessaires pour obtenir la guérison rend le traitement peu pratique.

Le « 606 » méritait d'être essayé, et, étant données la fréquence et la gravité de la maladie à Alger, nous étions admirablement placés pour constater l'action de ce produit.

Nous avons déjà annoncé (1) le résultat obtenu sur 9 chevaux ou mulets. Nos essais ont été poursuivis et nous avons actuellement un total de 43 animaux traités.

Après quelques tâtonnements pour fixer la dose convenable, nous avons remarqué que la dose relativement faible d'un gramme donne d'aussi bons résultats que des doses plus élevées. Nous employons le « 606 » (2) en injection intraveineuse en suivant la technique de préparation indiquée par Ehrlich.

A cette dose nous n'avons jamais observé aucun phénomène général à la suite de l'injection. La température reste stationnaire. Une seule injection de 3 grammes pratiquée sur une mule, a été suivie de légères coliques et de diarrhée.

L'effet de l'arsénobenzol sur les lésions lymphatiques est rapide. Lorsque l'affection est récente, que la plaie initiale est située dans les parties moyennes des membres (genou, haut du canon), celle-ci se cicatrise généralement vite, les cordes diminuent de volume et les boutons déjà apparents s'ouvrent et s'indurent. Cordes et nodules deviennent indolores à la pression.

Si la maladie est plus ancienne et la plaie initiale située dans les régions inférieures des membres, l'effet de l'injection se manifeste souvent par l'apparition de nouveaux boutons sur le trajet lymphatique malade. Les boutons existants s'abcèdent et se vident. On dirait que l'organisme réagit en expulsant les parasites et un observateur non prévenu pourrait prendre ces phénomènes de défense pour une aggravation du mal.

Il est nécessaire, pour juger des résultats d'une injection, d'attendre trois semaines à un mois. A ce moment, la guérison est assurée lorsque les cordes ont disparu ou diminué considé-

(1) *Bull. Soc. path. exot.*, t. IV, 1911, pp. 380 et 384.

(2) Le dioxydiamidoarsénobenzol (ou 606 d'Ehrlich) que nous avons eu à notre disposition nous avait été remis par M. le Dr A. Calmette, et provenait en partie du laboratoire du professeur Ehrlich, en partie de la maison Poulenc frères, de Paris.

rablement, qu'elles sont devenues indolores à la pression et que la plaie initiale est cicatrisée; les nodules qui existent encore, fermés ou ouverts, n'ont aucune importance. Si, au contraire, la plaie initiale reste ouverte et que la sensibilité de la corde persiste, il convient de renouveler l'injection.

Le tableau suivant résume nos essais jusqu'au 15 mars 1912.

On peut remarquer que les animaux qui ont dû être abattus, soit pour cause d'infection purulente, soit par raison économique, avaient tous été infectés par une plaie des parties inférieures des membres : boulet ou pâturon.

Dans deux cas (chevaux 24 et 30) nous avons fait administrer de l'iodure de potassium, à la dose de 10 grammes par jour dans l'eau de boisson, dès le lendemain de l'infection et pendant une période de quinze jours. Ce traitement mixte n'a pas paru donner de résultats plus rapides que l'injection seule de « 606 ».

Il est difficile d'établir le pourcentage des guérisons d'après ce tableau, un certain nombre de malades ayant été traités depuis trop peu de temps, mais si l'on considère qu'une grande partie des animaux qui nous ont été amenés pour subir l'injection de « 606 » étaient difficilement opérables, à cause de l'étendue ou du siège des lésions, on voit que le nouveau médicament peut rendre d'importants services dans le traitement de la lymphangite épizootique (1).

Lorsque la corde lymphatique est bien délimitée, qu'elle est située dans une région où l'ablation des lésions peut être faite sans grands inconvénients, l'opération chirurgicale est toujours à recommander. Le traitement par l'injection intraveineuse d'arsénobenzol est, au contraire, indiqué lorsque les lésions étendues sont inopérables, que leur siège ne permet pas sans

(1) De l'action curative du « 606 » dans la lymphangite épizootique, on ne saurait tirer de déductions sur la nature discutée du parasite, Cependant une observation de Pinoy et Ravaut (communication orale), rapprochée des faits que nous venons d'exposer, tendrait à confirmer la nature blastomycétique du cryptocoque de Rivolta : ces auteurs ont obtenu une guérison rapide d'une mycose humaine (gommes à levures, cultures positives) par l'emploi du « 606 ».

Ces résultats ouvrent au « 606 » un nouveau champ d'action dans le domaine des affections mycosiques.

NUMÉROS	DÉSIGNATION des animaux	ÉTAT DE LA MALADIE au début du traitement	NOMBRE des injections	DATE DES INJECTIONS	SIÈGE de la plaie initiale	RÉSULTATS
1	Cheval barbe.	Ancienne. Très grave.	3	20 novembre 1910, 2 février 1911, 22 avril 1911.	Boulet.	Guérison.
2	Id.	Récente. Bénigne.	1	8 décembre 1910.	Canon.	Id.
3	Cheval breton.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	4 janvier 1911.	Abdomen.	Id.
4	Mule.	Récente. Grave.	2	19 janvier, 2 mai 1911.	Genou.	Id.
5	Mule.	Récente. Assez grave.	2	19 janvier, 2 mai 1911.	Canon.	Id.
6	Cheval barbe.	Très ancienne. Très grave.	1	4 février 1911.	Pâturon.	Mort le 9 février 1911. Infection purulente.
7	Cheval breton.	Ancienne. Grave.	3	9 février, 11 mars, 22 avril 1911.	Abdomen.	Guérison.
8	Mulet.	Ancienne. Grave.	2	24 février, 22 avril 1911.	Jarret.	Id
9	Cheval breton.	Ancienne. Assez grave.	1	11 mars 1911.	Epaule (trajet d'un séton).	Id.
10	Cheval barbe.	Ancienne. Grave.	2	29 avril, 24 juin 1911.	Boulet.	Id.
11	Id.	Récente.	1	24 mai 1911.	Abdomen.	Id.
12	Id.	Récente. Grave.	1	27 mai 1911.	Jarret.	Abattu le 30 mai.
13	Jument bretonne.	Ancienne. Généralisée.	1	8 juin 1911.	"	Guérison.
14	Cheval barbe.	Ancienne. Opéré quatre fois. Récidive.	2	8 juin, 27 septembre 1911.	Flanc.	Id.
15	Id.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	10 juin 1911.	Id.	Abattu fin juillet.
16	Id.	Ancienne. Opéré. Récidive.	2	22 juin, 13 juillet 1911.	Genou.	Id.
17	Id.	Ancienne.	2	24 juin, 13 juillet 1911.	Canon.	Guérison.
18	Cheval anglo-arabe.	Ancienne. Grave.	1	19 août 1911.	Boulet.	"
19	Cheval barbe	Ancienne.	1	20 août 1911.	Pâturon.	Guérison.
20	Id.	Récente. Grave.	2	20 octobre, 10 novembre 1911.	Boulet.	Abattu. Infection purulente.
21	Id.	Ancienne. Grave.	1	[illegible] 1911.	Id.	Id.
22	Id.	Récente. Bénigne.	1	6 décemdre 1911.	Genou.	Guérison.
23	Id.	Récente. Bénigne.	1	6 décembre 1911.	Boulet.	Id.
24	Id.	Récente. Grave.	1	18 décembre 1911.	Id.	Abattu 29 janvier 1912. Infection purulente.
25	Id.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	18 décembre 1911.	Id.	Guérison.
26	Cheval breton.	Ancienne. Bénigne.	1	23 décembre 1911.	Canon.	Id.
27	Mulet.	Ancienne. Grave.	2	23 décembre, février 1912.	Boulet.	Abattu (par économie).
28	Cheval barbe.	Ancienne. Assez grave.	2	27 décembre 1911, 20 février 1912.	Id.	En voie de guérison.
29	Id.	Récente. Bénigne.	1	27 décembre 1911.	Canon.	Guérison.
30	Cheval percheron.	Récente. Grave.	2	27 décembre 1911, 20 février 1912.	Jambe.	Id.
31	Cheval barbe.	Ancienne. Opéré. Récidive	1	29 décembre 1911.	Thorax.	Id
32	Id.	Récente. Bénigne.	1	10 janvier 1911.	Genou.	Id.
33	Id.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	10 janvier 1911.	Boulet.	En voie de guérison.
34	Mule.	Récente. Assez grave.	2	12 janvier, 13 mars 1911.	Canon.	Id.
35	Cheval barbe.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	17 janvier 1912.	Boulet.	Guérison.
36	Mule.	Récente. Bénigne.	2	18 janvier 1912.	Genou.	Id.
37	Cheval breton.	Récente. Assez grave.	1	20 janvier, février 1912.	Thorax.	"
38	Id.	Récente. Bénigne.	1	29 janvier 1912.	Canon.	Guérison.
39	Cheval barbe.	Récente. Bénigne.	1	31 janvier 1912.	Boulet.	Id.
40	Id.	Récente. Opéré partiellement.		31 janvier 1912.	Genou.	En voie de guérison.
41	Cheval anglo-normand.	Ancienne. Grave.	1	2 mars 1912.	Boulet.	"
42	Cheval barbe.	Ancienne. Opéré. Récidive.	1	5 mars 1912.	Jarret.	
43	Id.	Ancienne. Grave.	1	12 mars 1912.	Thorax.	"

dangers, les délabrements nécessaires, ou encore lorsque l'affection, récente, peut être traitée sans arrêter le travail de l'animal malade. Il peut être avantageux, dans certains cas, d'associer les deux méthodes d'intervention, en excisant certaines lésions facilement abordables et en complétant le traitement par l'injection de « 606 ».

Enfin, lorsque l'opération chirurgicale est suivie de l'apparition de nouveaux boutons, le traitement interne trouve son indication.

Le cas, cité plus haut, de lymphangite épizootique chez l'homme, s'est terminé par une guérison radicale en trois jours, après une injection intraveineuse de 0 gr. 60 de « 606 ».

Essais de prophylaxie.

Avant nos premiers essais de traitement par le « 606 » nous avions voulu voir si des injections hypodermiques de levures sur les animaux à lymphangite épizootique n'auraient pas un effet favorable sur le cours de la maladie en amenant la production d'anticorps capables d'exercer leur action sur les cryptocoques.

Le cheval n° 1 avait ainsi reçu 5 injections de levures aux dates suivantes : 6 juin 1910, 14 juin, 30 juin, 13 juillet, 14 août. La première — récolte de 3 tubes de gélose (levures de riz et de bière), dans 30 cent. cubes d'eau physiologique — provoqua un engorgement qui disparut rapidement. La seconde occasionna un œdème assez volumineux qui mit une semaine à se résorber. La troisième amena la formation d'un abcès à chaque point d'injection. A la quatrième, des abcès volumineux se formèrent rapidement et s'ouvrirent en deux ou trois jours. A la cinquième (précédée, la veille, d'une injection de 2 cent. cubes seulement), tous les points d'injection furent le siège de nouveaux abcès qui évoluèrent en moins de quarante-huit heures.

Des constatations semblables furent faites sur un âne *neuf* que nous préparions en vue d'obtenir un sérum antilevures.

Nous avons assisté ainsi à des phénomènes qu'on peut rapprocher du « phénomène de Koch » (1) dans la tuberculose. L'orga-

(1) Il est difficile de dire s'il y a identité de phénomènes : dans le « phénomène de Koch » ce sont les bacilles hébergés par l'organisme qui provoquent son intolérance pour de nouveaux bacilles tuberculeux. Dans les

nisme manifeste à chaque injection nouvelle de levures une plus grande intolérance. Au lieu d'acquérir une immunité contre les levures il semble s'habituer à les expulser.

Ces observations nous ont donné l'idée de mettre à profit cette intolérance de l'organisme, dans un but prophylactique. Nous nous sommes demandé si un animal qui a reçu une injection de levures ne serait pas, par cela même, capable de mieux résister à l'invasion du cryptocoque, en expulsant plus facilement les parasites.

Une expérience actuellement en cours nous dira ce qu'il y a de fondé dans cette hypothèse : dans une écurie de 100 chevaux parmi lesquels on compte 10 p. 100 de lymphangiteux, la moitié environ de l'effectif a reçu dernièrement une injection de levures. Les chevaux de l'autre moitié serviront de témoins.

Tous les chevaux de l'écurie portant un numéro d'ordre, nous avons inoculé 46 chevaux à numéros impairs.

L'inoculation a été pratiquée le 3 mars. A l'heure actuelle — 23 mars — trois nouveaux cas de lymphangite épizootique ont été constatés sur des numéros pairs (témoins) : le premier (n° 38) le 18 mars, le second (n° 40) le 20, le troisième (n° 34) le 21. Les animaux voisins inoculés n'ont rien présenté d'anormal.

L'avenir nous apprendra s'il y a là autre chose qu'une heureuse coïncidence.

Conclusions générales.

L'observation clinique et les faits expérimentaux établissent que la lymphangite épizootique est transmissible par inoculation directe, que l'intervention d'insectes piqueurs n'est pas nécessaire.

L'étude des lésions jeunes montre que le cryptocoque de Rivolta n'est pas un parasite des leucocytes.

La morphologie, le mode de reproduction du parasite plaident en faveur de sa nature blastomycétienne.

phénomènes ci-dessus, il semble que l'organisme manifeste son intolérance même après s'être débarrassé des premières levures ; mais ce n'est pas certain. Pour pouvoir interpréter des faits d'une façon exacte, il faudrait savoir ce que sont devenues les premières levures introduites.

Les expériences de déviation du complément révèlent chez le cryptocoque et les levures des caractères d'étroite analogie.

Le « 606 » peut être utilisé avantageusement dans le traitement de la lymphangite épizootique.

Nous adressons nos vifs remerciements à M. le Dr Ch. Nicolle, de Tunis, qui a bien voulu nous envoyer des cultures de protozoaires, et à MM. Roig, vétérinaire à Rouïba ; Cavalin, Dauzon, Adrien et Georges Mantout, vétérinaires à Alger ; Ducher et Savary, vétérinaires militaires, qui ont eu l'amabilité de mettre à notre disposition de nombreux sujets d'expérience et de nous fournir les pièces et les matériaux d'étude.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XVII

Fig. I. — Coupe d'un vaisseau lymphatique infecté. Coloration par la méthode de Claudius. Gross. = 40 diamètres.

La coupe est pratiquée au niveau de deux nodules formés par des amas de cryptocoques. Ces foyers parasitaires sont mal délimités et des cryptocoques sont disséminés dans le tissu environnant. Les nodules sont séparés par du tissu conjonctif de réaction *m*.

Fig. II. — Même coupe vue en *n* (fig. I), au grossissement de 800 diamètres. On voit, dans la partie inférieure, quelques leucocytes parmi les cryptocoques : *a*, polynucléaires dont un renferme trois parasites ; *b*, mononucléaires ; *c*, formes de bourgeonnement.

Fig. III. — Frottis du contenu d'un nodule jeune. Gross. = 800 diamètres. Color. : méthode de Claudius.

Les cryptocoques sont libres. Les leucocytes polynucléaires *a* ou mononucléaires *b*, sont rares. Formes de bourgeonnement *c*, assez nombreuses.

Fig. IV. — Frottis du même produit coloré par la méthode de Dominici. Nombreuses formes de bourgeonnement.

SUR L'EXISTENCE DE LA RAGE CANINE DANS LE HAUT-SÉNÉGAL ET LE NIGER

par G. BOUFFARD,
Médecin-major de 1re classe des troupes coloniales,
Professeur à l'École d'application de Marseille.

(Travail du laboratoire de Bamako.)

On n'a encore donné aucune preuve de l'existence de la rage chez l'indigène de l'Afrique occidentale française. Quelques enquêtes, faites à différentes époques auprès des plus anciens administrateurs de notre empire de l'Ouest africain, sont restées négatives et n'ont pu apporter le plus petit indice permettant de croire à l'existence de la maladie. Alors qu'elle sévit si cruellement dans nos possessions indo-chinoises et malgaches, n'existerait-elle donc point dans l'Ouest africain, ou bien serait-elle ignorée de l'indigène, qui pourrait en être victime sans que son entourage en soit le moins du monde impressionné? C'est peu probable; le noir n'est point dépourvu d'un certain esprit d'observation, et s'il a reconnu de tout temps la maladie du sommeil, il est peu vraisemblable qu'il eût méconnu une maladie à symptômes aussi accusés, aussi terrifiants que ceux de la rage.

Dans les archives des directions du service de santé de l'Afrique occidentale française, on ne trouve trace d'aucune observation, d'aucune feuille clinique portant la mention « Rage »; mais on peut lire sur les certificats de rapatriement de certains fonctionnaires ou officiers, la mention : « Mordu par un chien enragé, évacué sur l'Institut de Bordeaux ou de Marseille pour y suivre le traitement antirabique. » Si donc la rage humaine ne paraît pas avoir été signalée en Afrique occidentale française, la rage canine y aurait été observée de tout temps. Elle est fort bien connue des indigènes, qui appellent « chiens fous » des chiens errants dant les morsures sont généralement mortelles pour leurs congénères, semblant

inoffensives pour les hommes. Nos administrateurs considèrent ces animaux commme enragés; ont-ils raison?

Le problème était intéressant à étudier; aussi, dès mon arrivée à Bamako, en 1906, je cherchai à me procurer un chien fou. L'administrateur Vidal, fort obligeant, m'aida dans la circonstance, et bientôt un agent de police m'en amenait un; malheureusement, l'animal brisait la mauvaise corde qui encerclait son cou, s'enfuyait dans la cour du dispensaire et mordait les deux chiens de garde de notre établissement d'assistance médicale. L'animal suspect gagnait la campagne et il ne nous restait que ses deux victimes.

L'une, chien à poil ras, de race locale, avait été mordue légèrement à la patte; elle resta avec nous pendant un an sans présenter les moindres symptômes morbides. L'autre, à poil long, provenant de la région de Tombouctou, était porteur d'une large et profonde déchirure de l'arcade sourcillière gauche. L'infirmier lava la blessure à l'eau tiède et la saupoudra de salol; après une semaine de traitement, la guérison était complète. Trois jours après, c'est-à-dire onze jours après la morsure, l'animal reste couché et mange très peu; le lendemain, il ne touche pas à sa pâtée et, de toute la journée, ne quitte pas sa niche. Le soir, vers six heures, il se lève et, l'œil vif, parcourt avec une agitation manifeste l'enclos où il est enfermé; je l'observe pendant plus d'une heure; de temps à autre, il titube, vacillant sur ses pattes de derrière; le lendemain matin, on le trouve mort dans sa cage.

L'autopsie ne révèle rien de particulièrement intéressant; l'estomac est vide.

Un morceau de bulbe, de la grosseur d'un petit pois, est broyé dans de l'eau stérile; quelques gouttes sont injectées sous la dure-mère d'un lapin, qui meurt accidentellement le cinquième jour; son bulbe ne fut pas virulent pour d'autres lapins; je perdais rapidement un virus que je ne devais retrouver qu'en 1908.

En 1907, au cours d'une tournée d'études de la maladie du sommeil sur les bords du fleuve Bani, je visitais un village, assez éloigné du cours d'eau pour être indemne de tsé-tsés et, par conséquent, habitable pour les chiens, qui ne peuvent vivre sur les bords de ce redoutable fleuve.

Un chef de village a toujours l'habitude, quand on l'interroge sur l'existence possible, sur son territoire, de la maladie du sommeil, de répondre évasivement et de tenter une digression en causant de choses et d'autres. Celui-ci me parlait constamment d'une maladie qui sévissait sur les chiens et me demandait un remède. Le village allait, disait-il, perdre ses fidèles serviteurs, très appréciés, non seulement pour les services rendus comme chiens de garde, mais aussi pour la succulence de leur chair, qui en faisait un produit de négoce très apprécié. « Nos chiens deviennent fous, mordent leurs congénères, sans épargner les noirs, et meurent. » Il m'affirma que les personnes mordues restaient indemnes, qu'il ignorait, ainsi que les habitants du village, la maladie dont je lui décrivais les principaux symptômes. J'étais malheureusement à la fin de ma tournée d'études, et je n'avais plus à ma disposition d'animaux neufs me permettant d'attendre l'occasion d'emporter le virus. Mon temps n'était point complètement perdu, puisque, faute de renseignements précis sur la maladie du sommeil, je trouvais, une fois de plus, confirmation de l'existence au Soudan d'une affection canine transmissible par morsure et paraissant bien être la rage.

Le 20 août 1909, un fonctionnaire qui s'intéressait à mes travaux, M. Constantin, rencontrait dans la ville administrative de Kouloubah un chien solidement attaché qui venait de mordre plusieurs indigènes et que l'on croyait atteint de rage. Il me le fit immédiatement conduire au laboratoire; l'animal présentait tous les signes de la rage mue; j'aurais pu entreprendre quelques expériences avant de sacrifier l'animal (morsure d'un autre chien, inoculation de la bave au lapin, etc.), mais je craignais de perdre ce virus par fugue de l'animal, aussi je le tuai par pendaison, à la mode indigène, et l'inoculation de son bulbe sous la dure-mère d'un lapin fut le point de départ de toute une série de recherches qui paraissent favorables au diagnostic de rage.

La technique employée est celle décrite dans tous les classiques : broyage d'une petite quantité de substance bulbaire dans un peu d'eau distillée stérile et inoculation, sous la dure-mère d'un lapin, de quelques gouttes du liquide.

Je n'ai pas la prétention d'apporter ici des expériences com-

plètes; des raisons multiples ne m'ont point permis de mettre ce travail expérimental à l'abri de toute critique. J'ai voulu simplement apporter une preuve expérimentale de l'existence de la rage canine, et je me suis adressé au lapin comme animal d'expérience.

Un lapin est donc inoculé le 10 août; jusqu'au 25, l'animal paraît en excellent état; il mange et n'a point maigri; le lendemain, il reste toute la journée tapi dans un coin de sa cage; quand on l'incite à se déplacer, on observe des troubles de la marche dus à une parésie du train postérieur; le 27 au matin, l'animal est couché avec de l'apnée, une paralysie complète du train postérieur; il meurt le soir. Avec son bulbe, on fait un passage sur deux lapins.

Du 10 août 1909 au 26 avril 1910, je fis 13 passages; la durée de l'incubation fut en moyenne de quinze à vingt jours, deux fois, de trente-cinq et trente-huit jours. Les animaux réagissaient presque toujours d'une façon identique; leur état général se maintenait excellent jusqu'à deux à trois jours avant la mort; ils perdaient alors l'appétit, restaient tapis dans un coin de leur cage et, quarante-huit heures avant le décès, survenaient généralement des signes de parésie suivis de paralysie complète du train postérieur. Trois fois, j'ai pu assister à des crises de rage furieuse; le lapin se précipitait à notre approche contre les parois de sa cage, les mordait; l'accès précédait généralement la mort de douze à vingt-quatre heures.

Pour chaque passage, je me servais toujours de deux ou trois lapins; j'évitais de la sorte la perte du virus par une mort prématurée consécutive à un accident ou à une maladie intercurrente. J'avais d'ailleurs constaté, dès le 1er janvier, que tous les animaux inoculés ne prenaient pas la rage; 1 sur 6 environ restait indemne, semblant réfractaire.

Rentrant très malade, à une saison où la durée du voyage sur le fleuve est longue, je ne pouvais songer à rapporter le virus rabique du Niger. Mon successeur continua les inoculations, mais, n'utilisant qu'un seul lapin, il perdit le virus au 21e passage; l'animal, inoculé le 10 mars 1910, restait indemne. Son histoire mérite d'être contée.

Ce lapin resta en observation pendant tout l'hiver sans présenter le moindre symptôme morbide. En avril, arrivait au

Laboratoire le Dr M. Blanchard, chargé de faire revivre cet établissement, qui n'avait plus de titulaire depuis près d'un an. Dans cette colonie, qui n'avait jamais pu, avant 1906, avoir à sa disposition d'une façon continue un vaccin antivariolique virulent, et qui, en quatre ans, avait vu un million de ses habitants immunisés contre la terrible endémie, il était tout naturel que le premier soin du Dr Blanchard fût de contrôler l'activité de la pulpe vaccinale de Bamako. Pour ce, il utilisa le lapin trépané sans résultat le 10 novembre 1909; il le rasa le 30 avril 1910 et beurra la surface rasée de pulpe vaccinale. Le surlendemain, l'animal présentait des signes de paralysie du train postérieur; le 3 mai, la paralysie était généralisée; la mort survenait le lendemain.

Blanchard pensa au réveil d'une rage latente et fit une série de passages les 3, 13 et 23 mai : la durée de l'incubation fut en moyenne de dix jours; les lapins mouraient paralysés; malheureusement, l'incident du 21e passage se reproduisit; l'unique animal, inoculé le 23 mai, résista à la dose de virus; Blanchard chercha à vaincre sa résistance par les procédés usuels; la vaccination resta inefficace; cette fois, le virus était définitivement perdu.

Il sera facile de le retrouver; le chien fou n'est pas, dans la boucle du Niger, une curiosité pathologique; il sera donc fort intéressant de reprendre ces recherches qui, loin d'être aussi rigoureuses et précises que je l'eusse voulu, méritaient cependant d'être publiées; elles pourront être utiles aux camarades que le sujet intéressera.

Bien que la rage humaine paraisse inconnue dans le Haut-Sénégal et Niger, je crois cependant que le fait d'avoir pu, pendant un an, transmettre de lapin à lapin, par injection intracranienne, une affection présentant tant de points communs avec la rage paralytique, plaide en faveur de l'existence de la rage canine dans cette colonie.

RECHERCHES

SUR LES PROPRIÉTÉS DU VIRUS RABIQUE

CONSERVÉ A L'ÉTAT SEC

par D. L. HARRIS,

Directeur du laboratoire municipal de pathologie et de bactériologie,
Saint-Louis (États-Unis).

La valeur du traitement antirabique de Pasteur une fois universellement reconnue, beaucoup de travaux ont été entrepris par d'autres investigateurs qui ont essayé, par différentes modifications à la méthode de Pasteur, de faciliter la préparation du matériel antirabique. Dans les petits laboratoires, où les malades sont en petit nombre, le travail journalier nécessaire pour avoir en tout temps une série complète de moelles empêche l'entreprise de ce traitement.

Nous ne voulons pas passer en revue les nombreuses méthodes proposées pour la simplification du traitement. Il suffit, pour le but de cet article, de noter que Vansteenberghe (1) a décrit une méthode pour la préservation du virus. Cet auteur a trouvé que, lorsque le cerveau est rapidement desséché dans le vide, sa virulence est conservée pendant plusieurs mois. Marie (2), Remlinger et Nouri (3), Harvey et Mac Kendrick (4), et d'autres, ont répété avec succès ces expériences, dont le fait essentiel est que le matériel doit être étendu en couche très mince et desséché dans un vide sulfurique rapidement produit. La quantité de substance conservée par cette méthode est trop petite pour être d'aucune valeur dans le traitement antirabique.

Nous (5) avons décrit une méthode (6) à l'aide de laquelle les

(1) Vansteenberghe, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1903, t. LV, p. 1046.

(2) Marie, L'étude expérimentale de la rage. *Encyclop. scient.*, 1909.

(3) Remlinger et Nouri, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1908, t. LXIV, p. 945.

(4) Harvey and Mc Kendrick, *Theory and practice anti-rabic immunization*, 43 pages in-4°. Calcutta, 1907.

(5) Harris et Shackell, *Journ. Infect. Dis.*, 1911, t. VIII, p. 47.

(6) Shackell, *Amer. Journ. of Physiol.*, 1909, t. XXIV, p. 325.

cerveaux et les moelles peuvent être desséchés *in toto*, et la virulence de ces organes peut être démontrée après plusieurs mois. Cette méthode consistait premièrement à congeler le cerveau avec un mélange de sel et de glace, et, ensuite, sans le laisser fondre, à le dessécher dans le vide sulfurique. De nombreux essais ont prouvé que la virulence restante était de 1 p. 100 de la quantité primitive. Il a fallu 0 c.c. 2 d'une dilution de 1 p. 100 (0 gr. 002) d'une moelle sèche pour provoquer la rage dans le délai usuel, tandis que 0 c.c. 2 d'une dilution de 1 p. 10.000 (0 gr. 00002) de moelle fraîche étaient suffisants pour produire la maladie dans le même temps.

Nous croyons que la dessiccation des moelles, d'après la méthode de Pasteur, produit une concentration progressive des sels et d'autres substances solubles contenues normalement dans les centres nerveux et que la destruction du virus est proportionnelle à cette concentration. D'un autre côté, quand les moelles sont successivement congelées, puis desséchées, la concentration des substances solubles et toxiques est évitée. Notre opinion est que le succès des expériences de Vansteenberghe dépend de la congélation du matériel dans le vide rapidement produit, et de la dessiccation sans concentration.

Depuis la publication de notre premier travail, j'ai essayé différentes méthodes dans le but d'augmenter la somme de virulence restant après dessiccation complète.

J'ai trouvé que, *plus complètement et plus rapidement le matériel est congelé, plus grande est la somme de virulence conservée*. Quand les cerveaux et les moelles ont été congelés avec de la neige de CO^2 et ensuite desséchés, d'après la méthode que nous allons décrire, on peut conserver de 30 à 50 p. 100 de leur virulence primitive. Il est préférable de réduire le matériel en poudre pour en faire des épreuves.

Les détails de la méthode sont les suivants : Un ou plusieurs cerveaux ou moelles sont écrasés dans un mortier de porcelaine en ajoutant, goutte à goutte, une petite quantité d'eau jusqu'à ce qu'on obtienne une pâte épaisse et homogène. Un peu de neige d'acide carbonique est ajoutée lentement à cette pâte, qui doit être constamment agitée durant l'opération pour éviter de la transformer en une masse solide. Après congélation

complète, le matériel est aussi fragile que du verre; alors, on le pulvérise, et très facilement. L'addition d'un peu de neige de temps en temps est nécessaire pour empêcher le mélange de se fondre. Le mélange de cerveau et de neige doit être transféré immédiatement dans un vase froid et placé au fond d'un exsiccateur, préalablement à demi enfoncé dans un mélange de sel et de glace à une température de — 18 degrés centigrades. Dans la partie supérieure de l'exsiccateur, un vase contenant de l'acide sulfurique repose sur un réseau de cuivre, de telle manière que l'air circule librement entre le vase contenant les moelles congelées et l'exsiccateur. On place l'acide à la partie supérieure du dessicateur pour éviter sa solidification, qui se fait quand elle est trop près du mélange réfrigérant. Le vide doit mesurer moins de 2 millimètres de mercure et l'exsiccateur doit être faiblement agité d'heure en heure pour répandre l'eau absorbée partout dans le vase renfermant l'acide. Un seul cerveau ou moelle traité de cette manière sera complètement desséché entre trente-six et quarante-huit heures : mais, jusqu'à la fin de l'opération, la température ne doit pas dépasser — 10 degrés centigrades.

Le produit desséché est une poudre très légère et assez hygroscopique. Il absorbe rapidement l'humidité atmosphérique jusqu'à 3 p. 100 ; alors, il se ramollit et, en quelques heures, perd toute sa virulence. Pour le protéger de toute humidité, nous l'avons scellé dans de petits tubes en verre.

Beaucoup d'expériences ont démontré que l'injection intracérébrale de 0 gr. 00002 de moelle desséchée produit les symptômes de la rage chez des lapins au 6e jour, et la mort au 7e ou 8e. L'injection de 0 gr. 00001 d'un mélange de cerveau et de moelles desséchés et conservés pendant un mois à une température de 8 degrés à 10 degrés centigrades, à l'abri de la lumière, avait produit la rage; après deux mois de conservation, sa virulence avait diminué de moitié; après trois mois, l'injection de 0 gr. 00005 était suivie de paralysie en sept jours. Quand le matériel est conservé en présence de P^2O^5, sa virulence diminue plus rapidement que lorsqu'il est conservé en présence de SO^4H^2.

Les lapins et les chiens peuvent être immunisés rapidement avec ce matériel par la méthode de Högyes. Nous avons immu-

nisé des chiens avec des moelles desséchées et conservées depuis trois mois.

Des expériences sont en voie d'exécution pour déterminer exactement les effets de la température, de la lumière et des substances chimiques sur la rapidité de la perte de la virulence. On peut si facilement peser cette poudre et déterminer si exactement ses propriétés, à n'importe quel moment, que des études sur ce sujet peuvent produire des données importantes. Les avantages de posséder du matériel d'une virulence connue et relativement permanente sont évidents.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

62e ANNÉE OCTOBRE 1912 N° 10

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA COAGULATION DU SANG ET LA GENÈSE DE LA THROMBINE

par les Drs J. BORDET et L. DELANGE

(Suite et fin.)

§ II. — La réaction des plaquettes avec le sérum.

Naunyn, Rauschenbach, Foa et Pellacani, Wooldridge, ont signalé l'action accélératrice de certains extraits d'organes (muscles, rate, foie, intestin, etc.), sur la coagulation du sang. Les travaux de Delezenne, de Spangaro, d'Arthus, ont montré combien la coagulation est hâtée lorsque le sang peut se mélanger, lors de la saignée, à des traces de suc de la plaie opératoire. Arthus a vu que le suc de tissu ne contient pas de thrombine préformée, car, même en milieu calcifié, il ne coagule pas la solution pure de fibrinogène. Morawitz, Fuld et Spiro ont mis en évidence ce fait capital que la teneur du sérum en thrombine s'élève considérablement lorsqu'on le mélange à l'extrait de tissus. Ces auteurs ont déduit de cette constatation que la thrombine naît de la réaction de deux substances, l'une existant dans les cellules de nombreux tissus — et aussi dans les cellules blanches du sang, — l'autre répandue dans le plasma dont le sérum dérive. Fuld et Spiro ont désigné ces matières, la première sous le nom de cytozyme, la seconde sous le nom de plasmozyme. Morawitz les a appelées respectivement thrombokinase et thrombogène.

D'après Morawitz et les autres auteurs qui se sont occupés de la thrombokinase ou cytozyme, cette substance est thermolabile ; cette opinion ne concorde nullement avec nos observations.

Nos expériences nous ont montré que les suspensions de plaquettes lavées se rapprochent beaucoup des extraits de tissus, en ce sens qu'elles sont aptes, au contact du sérum, à fournir la thrombine en abondance. Nous appellerons cytozyme (désignation appliquée par Fuld et Spiro au principe actif de l'extrait de tissus) la substance active des plaquettes, et nous nommerons sérozyme la substance à laquelle le sérum doit son pouvoir de réagir avec le cytozyme des plaquettes pour fournir la thrombine.

Exp. XIII. — Du plasma oxalaté très limpide de lapin, oxalaté à 1 p. 1000 est additionné de 4 volumes d'EPCa (1). En raison de la pauvreté en plaquettes, la coagulation s'opère lentement. On défibrine dès qu'elle débute et l'on obtient un sérum pauvre en thrombine, que l'on conserve jusqu'au lendemain en vue de diminuer encore son faible pouvoir coagulant. Le lendemain donc, on prépare les mélanges suivants :

On verse dans deux tubes A et B 0,4 cent. cube d'EPCa et dans un tube C, 0,5 cent. cube de cette même solution (laquelle sert de véhicule et introduit en même temps un peu de sel calcique). On ajoute à A et B 0,1 cent. cube de sérum, obtenu comme il vient d'être dit. On laisse tomber ensuite en A et C une goutte de plaquettes lavées en suspension dans la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000, en B une goutte de cette solution sans plaquettes. Bref, l'un des tubes (A) renferme à la fois du sérum et des plaquettes, les deux autres contiennent uniquement, soit du sérum, soit des plaquettes. Quelques minutes plus tard, on introduit dans les trois tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation en bloc survient dans A en 3 à 4 minutes, C ne se coagule jamais, B reste liquide ou n'est que partiellement coagulé le lendemain (2).

L'addition de plaquettes, non coagulantes par elles-mêmes, à une dose de sérum d'ailleurs faible, a donc eu pour effet de rendre le liquide énergiquement coagulant. Il convient de rappeler que les plaquettes ont été, grâce à un lavage soigneux, débarrassées entièrement du plasma dans lequel elles bai-

(1) Rappelons une fois pour toutes que EPCa signifie solution physiologique de NaCl à 9 p. 1000 contenant environ un tiers p. 1000 de $CaCl^2$, et que le plasma dilué dioxalaté est préparé par mélange de 1 volume de plasma limpide oxalaté à 1 p. 1000, avec 4 volumes de solution physiologique oxalatée à 2 p. 1000.

(2) La coagulation pénible qui s'opère en B tient naturellement à ce que ce mélange contient un peu de sérum, d'ailleurs pauvre en thrombine.

gnaient. Au surplus, il est aisé de prouver que les propriétés de la suspension de plaquettes ne sont nullement dues à une souillure éventuelle par des traces de plasma :

Exp. XIV. Identique à la précédente, sauf que dans les tubes A et C on introduit, au lieu d'une goutte de plaquettes, une goutte de plasma oxalaté très limpide. On ajoute après quelques minutes le plasma dioxalaté. Les mélanges sont encore liquides le lendemain.

Nous venons de voir que les plaquettes sans le secours du sérum, et même en milieu calcifié, ne libèrent pas de thrombine. Ajoutons qu'elles n'en libèrent pas davantage lorsque le contact avec le liquide calcifié dure longtemps. Elles n'en libèrent pas non plus au contact d'eau distillée (très légèrement calcifiée).

Morawitz, Fuld et Spiro ont vu que la production de thrombine dans le mélange de sérum avec l'extrait de tissus exige la présence de sels calciques solubles. Ceux-ci sont également nécessaires à la réaction qui s'établit entre les plaquettes et le sérum ; en milieu oxalaté, il ne se forme pas de thrombine. Les plaquettes ne favorisent nullement la coagulation du plasma par le sérum en milieu décalcifié; l'expérience suivante démontre au surplus la nécessité des sels calciques :

Exp. XV. — Deux tubes A et B contiennent 0,35 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum (obtenu comme celui des expériences précédentes). Le tube A reçoit en outre 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100. On ajoute alors aux deux tubes une goutte de plaquettes. Après un quart d'heure de contact, on introduit en B (qui n'a pas été oxalaté antérieurement) 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100, et, 5 minutes plus tard, on additionne les deux tubes de 0,5 cent cube de plasma oxalaté dilué de 4 volumes de solution physiologique oxalatée à 1 p. 1000 (plasma dilué monoxalaté). Le liquide B se prend en masse en une minute, l'autre est encore fluide le lendemain.

On le voit, le mélange plaquettes-sérum ne fournit la thrombine qu'à la condition d'être réalisé en milieu calcifié. Mais si cette condition est remplie, le mélange peut, même s'il a été ultérieurement oxalaté, coaguler le plasma oxalaté.

En proportion convenable, le citrate sodique empêche la réaction même en milieu calcifié. On sait, par les recherches de Sabbatani, que, sans précipiter les sels calciques, le citrate met obstacle à leur ionisation. C'est ainsi qu'il s'oppose à leur pré-

cipitation par l'oxalate sodique. Dans un mélange de 0,2 cent. cube de plasma oxalaté, de 0,1 cent. cube de citrate sodique à 4 p. 100 et de 0,8 cent. cube d'EPCa, on ne constate pas l'apparition d'un trouble d'oxalate calcique, et le mélange ne se coagule pas. On sait d'autre part que le citrate se comporte comme l'oxalate, en ce qu'il n'empêche pas la coagulation par la thrombine lorsque celle-ci a pu se former au préalable :

Exp. XVI. — Quatre tubes contiennent 0,3 cent. cube d'EPCa et 0,2 cent. cube de sérum; on ajoute dans A 0,1 cent. cube de solution de citrate à 2 p. 100, et dans C et D même dose de solution physiologique. On laisse tomber ensuite une goutte de plaquettes en A, B et C. Quinze minutes plus tard on additionne B (qui n'avait reçu ni citrate ni solution physiologique) de 0,1 cent. cube de citrate, et l'on verse dans les quatre tubes, immédiatement après, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation en bloc survient dans B et C en une minute et demie. Dans A et D la coagulation n'est que partielle le lendemain.

La forte concentration saline s'oppose aussi à la production de thrombine aux dépens des plaquettes et du sérum. Si l'on dilue une solution concentrée de sel avec de l'eau distillée, et si l'on ajoute du sérum et des plaquettes, il y a formation de thrombine, qui coagule le plasma dioxalaté introduit après quelque temps. Mais si l'on mélange le sérum et les plaquettes dans la solution concentrée et si, après quelque temps, on ajoute l'eau distillée et, immédiatement après, le plasma dioxalaté, la coagulation ne s'opère pas :

Exp. XVII. — Une solution de NaCl à 10 p. 100 est additionnée de $CaCl^2$ de telle façon que sa teneur en ce dernier sel soit quadruple de celle de l'EPCa. On verse dans deux tubes A et B 0,2 cent. cube de cette solution concentrée et l'on ajoute à B 1,8 cent. cube d'eau distillée. On introduit ensuite dans chaque tube 0,4 cent. cube de sérum et 3 gouttes de plaquettes. Quarante minutes plus tard, on ajoute à A 1,8 cent. cube d'eau distillée et immédiatement après, aux deux tubes, 1,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en B en cinq minutes, A est encore liquide le lendemain. La teneur saline ne doit donc pas être exagérée. Elle peut par contre, sans que cela nuise à la réaction du sérum sur les plaquettes, être abaissée dans une forte mesure :

Exp. XVIII. — On introduit dans un tube 0,4 cent. cube d'eau distillée contenant 0,3 p. 1000 de $CaCl^2$. On ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de plaquettes. Vingt minutes plus tard, on introduit 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Coagulation en moins d'une minute. Un mélange témoin montre que si l'on n'avait pas introduit de sérum, aucune coagulation ne se serait produite.

Reprenons maintenant la première expérience du présent chapitre (exp. XIII), et recherchons dans quelle mesure nous pouvons diminuer la dose de sérum tout en obtenant encore la coagulation du plasma dioxalaté. Le sérum éprouvé est obtenu comme dans les expériences précédentes, c'est-à-dire qu'il résulte de la défibrination de plasma oxalaté très limpide additionné de 4 volumes d'EPCa, et qu'il date de vingt-quatre heures environ.

Exp. XIX. — Ce sérum est introduit à doses variables dans des tubes contenant 0,5 cent. cube d'EPCa et une goutte de plaquettes. Après un quart d'heure on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi qu'en présence des plaquettes une dose de 0,02 cent. cube de sérum suffit à provoquer la coagulation. Une dose moitié moindre (0,01) est inopérante : le mélange est encore liquide le lendemain. La dose minimale active se détermine ainsi assez nettement.

On peut d'autre part rechercher, en faisant agir une dose de sérum assez forte (0,1 ou 0,2 cent. cube par exemple), de combien on peut diluer la suspension de plaquettes pour qu'une goutte de cette dilution soit encore capable de provoquer la coagulation. La numération des plaquettes est naturellement chose difficile; nous nous bornerons à mentionner que les plaquettes agissent à dose très faible : si l'on introduit dans un tube contenant 0,5 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum, une goutte de suspension de plaquettes assez diluée pour que le mélange ne présente qu'un trouble extrêmement faible, presque imperceptible même, le plasma dioxalaté ajouté ultérieurement se coagule encore.

Il est aisé de déterminer la durée minima de contact entre les plaquettes et le sérum, que la production de thrombine exige. Cette détermination n'a d'ailleurs qu'une précision relative, car les résultats varient bien entendu suivant les conditions de dilution, peut-être aussi suivant la température ambiante, etc. On doit néanmoins conclure que la réaction entre les plaquettes et le sérum n'est pas instantanée, elle exige un temps mesurable, à vrai dire assez court. Citons une expérience :

Exp. XX. — Plusieurs tubes renferment 0,45 cent. cube d'EPCa et 0,05 cent. cube de sérum. On introduit une goutte de plaquettes, puis au bout de temps variables, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi

que le mélange où le plasma a été ajouté une minute et demie après les plaquettes, se coagule en trois minutes et demie. Par contre, le mélange où le plasma a été ajouté 45 secondes après les plaquettes, est encore liquide une heure plus tard. Ce n'est qu'au bout d'une heure 45′ qu'une coagulation lâche et partielle s'y effectue.

On a depuis longtemps reconnu que la thrombine ne se comporte pas, à proprement parler, comme les ferments, qui peuvent modifier des quantités quasi illimitées de substance et ne semblent guère se consommer en agissant. Une dose donnée de thrombine ne peut solidifier qu'une dose donnée de fibrinogène. Aussi, par des expériences analogues à celles qui précèdent, constate-t-on que la coagulation s'opère moins facilement lorsqu'on emploie, au lieu de plasma dioxalaté dilué au cinquième, du plasma dioxalaté non dilué. Le contraste est beaucoup plus frappant si l'on a recours à la technique de l'oxalatation séparée.

Exp. XXI. — Quatre tubes ABCD contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa, 0,05 cent. cube de sérum, une goutte de plaquettes. Un quart d'heure après la confection de ces mélanges, on ajoute à A 0,5 cent. cube de plasma dioxalaté dilué (obtenu comme d'habitude par mélange de 1 vol. de plasma oxalaté avec 4 vol. de solution physiologique [oxalatée à 2 p. 1000), à B 0,5 cent. cube de plasma dioxalaté non dilué. Quant à C et D, on les oxalate à 1 p. 1000 (par mélange avec 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100), puis, 5 minutes plus tard, on les additionne respectivement de 0,5 cent. cube soit de plasma dilué, soit de plasma non dilué, oxalatés tous deux à 1 p. 1000. A se coagule en 4, B en 7, C en 8 minutes, D est encore liquide le lendemain.

Nous avons rappelé antérieurement ce fait que la thrombine du sérum issu de la coagulation d'un plasma s'affaiblit rapidement par la conservation; plus le sérum a vieilli, moins il se montre, après oxalatation à 1 p. 1000, apte à coaguler le plasma oxalaté; nous avons vu que l'atténuation est beaucoup moins constatable si le sérum n'est pas oxalaté, mais est ajouté à volume égal de plasma dioxalaté. Il est à peine besoin de dire que la thrombine issue de la réaction entre le sérum et les plaquettes se comporte de même :

Exp. XXII. — On prépare de la thrombine par mélange de sérum et de plaquettes en EPCa, et l'on évalue, à différents moments, son énergie coagulante, soit (en l'oxalatant à 1 p. 1000), vis-à-vis de volume égal de plasma dilué mono-oxalaté, soit (sans l'oxalater) vis-à vis de plasma dilué dioxalaté. Les temps de coagulation sont : suivant la technique de l'oxalatation séparée,

respectivement quatre et trente minutes pour la thrombine âgée de vingt minutes ou de deux heures; quand la thrombine est vieille de cinq heures, elle est incapable de provoquer la coagulation; suivant la technique de la dioxalatation du plasma, respectivement de deux et de quatre minutes pour la thrombine âgée de deux heures (ou moins) et de dix heures. On peut donc être assuré (c'est un fait que nous utiliserons plus loin) de ce qu'un mélange où la thrombine s'est formée la veille ne se montrera plus capable, si on l'oxalate séparément, de provoquer à bref délai la coagulation de volume égal de plasma oxalaté.

La substance propre au sérum, qui réagit avec les plaquettes pour donner la thrombine, et que nous appelons le sérozyme, est thermolabile. Elle est détruite par le chauffage d'une demi-heure à 55°.

D'autre part, le sérum perd également tout pouvoir de réagir avec les plaquettes lorsqu'on le traite par une dose convenable de suspension de sulfate de baryte. Bordet et Gengou ont constaté (1) que le contact avec divers précipités minéraux, notamment $CaFl^2$ et SO^4Ba, prive les plasmas de leur coagulabilité : les principes actifs adsorbés disparaissent du liquide ambiant; de même, ces précipités peuvent s'emparer de la thrombine du sérum. Un plasma traité par SO^4Ba, incoagulable même en milieu calcifié par ses propres moyens, se coagule par l'addition de sérum, à moins que celui-ci n'ait été lui-même traité par SO^4Ba.

Exp. XXIII. — Du sérum (obtenu comme d'habitude par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa) est introduit, à dose de 1 cent. cube, dans deux tubes A et B. On laisse tomber dans B, 6 gouttes de solution physiologique, dans A, 6 gouttes de suspension assez épaisse de SO^4Ba (2). Après un contact d'une demi-heure, on centrifuge et décante; on obtient ainsi les sérums A et B.

Dans deux tubes AA et BB, contenant 0,4 cent. cube d'EPCa, on introduit 0,1 cent. cube soit de sérum A, soit de sérum B, puis une goutte de plaquettes. Un quart d'heure plus tard, on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté; BB se coagule en trois minutes, AA est encore liquide après deux jours.

Le sérozyme étant adsorbé par SO^4Ba, le sérum n'est désormais pour les plaquettes qu'un liquide indifférent. Or, on constate que le plasma se comporte de même, c'est-à-dire qu'après traitement par SO^4Ba, il ne se coagule

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904, p. 36. (Le plasma fluoré).

(2) Le précipité de SO^4Ba préparé par mélange de $BaCl^2$ avec SO^4Na^2 est lavé à plusieurs reprises, à l'aide de centrifugations et décantations successives, par de grands volumes de solution physiologique de NaCl; on le délaie finalement dans un peu de cette solution, de manière à obtenir une suspension assez épaisse.

pas par l'addition de plaquettes lavées. On prépare aisément le plasma baryté spontanément incoagulable, en mélangeant 30 gouttes de suspension de SO^4Ba, 4 cent. cubes d'EPCa et 1 cent. cube de plasma oxalaté limpide. Après plusieurs heures de contact, on centrifuge et décante. Ajoutons que ce plasma se coagule par addition de sérum frais, et mieux encore (la coagulation est alors presque instantanée) par l'addition d'un peu de sérum et d'une goutte de plaquettes.

Le fait qu'un tel plasma reste liquide quand on y introduit des plaquettes sans sérum démontre définitivement que ces éléments sont incapables de solidifier le fibrinogène pur. Le plasma baryté représente en réalité un fibrinogène mieux débarrassé des générateurs de la thrombine que ne le sont en général les solutions dites pures de fibrinogène que l'on obtient par précipitations successives sous l'influence du sel concentré. Il est probable que, dans ces solutions, un peu de sérozyme peut prendre naissance, ce qui explique leur coagulabilité, que divers auteurs ont signalée (Morawitz, Nolf), par addition de plaquettes. Citons une expérience relative au plasma baryté :

Exp. XXIV. — Dans trois tubes ABC on introduit 1 cent. cube de plasma baryté. On ajoute au tube A 3 gouttes de suspension de plaquettes, au tube B 0,2 cent. cube de sérum (fraîchement obtenu) provenant de plasma oxalaté limpide recalcifié par 4 vol. d'EPCa, au tube C même dose du même sérum mais qui au préalable a été additionné d'une trace de plaquettes. A ne se coagule pas, B se coagule en dix-sept minutes, C en moins d'une minute.

D'autre part, le sérozyme n'est pas absorbé par des globules sensibilisés, de telle sorte qu'il ne paraît point devoir être identifié avec l'alexine. Le sérum (obtenu comme d'habitude) mélangé à un excès de globules de chèvre sensibilisés par du sérum de lapin antichèvre (chauffé au préalable à 56 degrés), puis séparé par centrifugation, produit encore de la thrombine lorsqu'on l'additionne de plaquettes.

Le mélange sérum-plaquettes, qui coagule presque instantanément le plasma baryté, agit de même, ainsi qu'il faut s'y attendre, vis-à-vis de divers liquides contenant du fibrinogène, tels que le liquide surnageant obtenu par centrifugation de l'exsudat péritonéal leucocytaire dont nous avons parlé antérieurement, ou bien encore le liquide surnageant (resalé et recalcifié) que l'on décante après centrifugation de plasma

oxalaté traité par l'eau distillée et CO^2, et dont il a été question plus haut. Ces deux liquides, nous l'avons vu, sont quasi-incoagulables spontanément, mais, à vrai dire, peuvent se coaguler par addition de plaquettes, ce qui démontre que du sérozyme peut y prendre naissance. Nous jugeons inutile d'insister sur le détail de ces expériences. Ajoutons néanmoins, ici, que le sédiment séparé par centrifugation de plasma oxalaté limpide additionné de 9 volumes d'eau distillée et traité par CO^2 se comporte comme s'il contenait quelques plaquettes, en ce sens qu'additionné de sérum, il développe de la thrombine. Ceci vient corroborer l'idée, exprimée dans notre paragraphe I[er], que le plasma oxalaté, même très limpide, contient encore des traces de plaquettes auxquelles il doit sa coagulabilité par recalcification, et dont précisément on peut le priver par l'action combinée de l'eau distillée et de CO^2.

Le sérozyme (ou les substances dont il peut dériver) est-il largement répandu dans les liquides de l'organisme ? Nous n'avons examiné à cet égard que l'humeur aqueuse et l'exsudat péritonéal normal. L'humeur aqueuse n'en contient pas ; l'exsudat péritonéal en renferme, mais beaucoup moins que le sérum.

Nous avons vu antérieurement que l'exsudat péritonéal leucocytaire obtenu chez le lapin, ou de préférence chez le cobaye, par injection de solution physiologique ou de bouillon se coagule paresseusement et peut même fournir, par centrifugation, un liquide surnageant incoagulable, mais qui se prend en masse par addition de plaquettes, celles-ci accélérant d'ailleurs beaucoup, même à dose assez faible, la prise en caillot de l'exsudat total, d'où la conclusion que les leucocytes sont inférieurs aux plaquettes en ce qui concerne la production de la thrombine. Cette conclusion est confirmée par l'étude comparée de l'aptitude des plaquettes et des leucocytes à fournir la thrombine par mélange avec le sérum. Comme beaucoup d'autres cellules, les leucocytes lavés dont on obtient une suspension aux dépens d'un exsudat péritonéal libèrent de la thrombine au contact du sérum. Mais les suspensions de plaquettes nous ont paru, à cet égard, beaucoup plus actives : elles agissent encore puissamment, à des dilutions extrêmes, ce qui n'est pas le cas pour l'émulsion leucocytaire. Nous avons l'impres-

sion que le cytozyme des leucocytes est moins utilisable pour la coagulation que ne l'est celui des plaquettes, sans doute parce qu'il reste davantage confiné dans la trame de l'élément cellulaire; s'il n'en était pas ainsi, on ne concevrait guère pourquoi l'exsudat péritonéal, très riche en leucocytes, se coagule plus vite par l'addition de plaquettes. Cependant le cytozyme des leucocytes peut être utilisé dans une certaine mesure, puisque cet exsudat, bien que lentement coagulable, se prend néanmoins en masse plus vite que le même liquide débarrassé des cellules, et que, d'autre part, sous l'influence d'une addition de sérum, l'exsudat se coagule aussi plus vite lorsqu'il contient encore ses leucocytes que lorsqu'on l'en a dépouillé. Ces considérations, rappelons-le, sont en harmonie avec celles que suggère la coagulation du sang d'oiseau qui renferme des leucocytes, mais point de plaquettes.

Les auteurs qui se sont occupés des plaquettes croyaient que les propriétés de ces éléments ne résistaient guère au chauffage; il n'en est rien; le principe actif peut, sans dommage, être porté à 100 degrés. Nous l'avons vu plus haut, les plaquettes chauffées un quart d'heure à 100 degrés, ou même qui ont subi, à quelques jours d'intervalle, trois chauffages pendant cinq à dix minutes à cette température et ont été ainsi stérilisées, accélèrent encore fortement la coagulation du plasma dilué recalcifié. De même, elles ont gardé toute leur aptitude première à former la thrombine avec le concours du sérum. Le sérozyme n'est visiblement atteint que si l'on chauffe les plaquettes à 120 degrés dans l'autoclave :

Exp. XXV. — Quatre tubes A, B, C, D contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum, obtenu la veille par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes d'EPCa. On laisse tomber en A une goutte de suspension de plaquettes non chauffée, en B une goutte de suspension chauffée 30 minutes à 65 degrés, en C, une goutte de suspension chauffée 15 minutes à 100 degrés, en D une goutte de suspension chauffée 15 minutes à 120 degrés. Un quart d'heure plus tard, on ajoute à tous les tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A, B se coagulent en 3 minutes, C en 3 min. 10 secondes, D est encore liquide au bout de plusieurs heures.

Le liquide transparent que l'on obtient en centrifugeant une suspension stérilisée est parfaitement actif, même s'il a été conservé pendant trois mois en tube scellé.

Exp. XXVI. — Trois tubes A, B, C contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa, 0,1 cent. cube de sérum; on ajoute à A une goutte de l'extrait limpide de

plaquettes stérile conservé pendant trois mois, à B une goutte de plaquettes fraîches. On introduit ensuite, dans les trois tubes, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A se coagule en 2 minutes, B en 3, C est encore liquide le lendemain.

La diffusion du cytozyme hors des plaquettes se fait d'ailleurs à froid assez rapidement : une suspension de plaquettes centrifugées quarante-huit heures après sa préparation fournit un liquide surnageant qui réagit fort bien avec le sérum pour donner de la thrombine.

Jusqu'ici nous avons toujours employé du sérum pour provoquer sur les plaquettes la réaction qui donne naissance à la thrombine. Mais on doit évidemment se demander si le principe du sérum qui réagit avec les plaquettes n'existe pas déjà, avec les mêmes propriétés, dans le plasma oxalaté que l'on vient de recalcifier et qui n'a pas encore eu le temps de subir les modifications dont le terme est la coagulation. L'expérience plaide pour la négative. Un tel plasma ne se comporte pas, lorsqu'on y ajoute des plaquettes, comme le sérum ; pour trouver de la thrombine dans le mélange, il faut attendre un certain temps, à la vérité pas très long, car on sait qu'un mélange de plasma recalcifié et de plaquettes se coagule vite et équivaut donc bientôt à du sérum. Mais dans le mélange sérum-plaquettes, l'apparition de thrombine est plus prompte ; elle peut, nous l'avons vu, se produire en moins de deux minutes. En opérant soigneusement, on peut comparer, au point de vue du temps qu'exige la production de la thrombine, un mélange de plaquettes et de plasma dilué que l'on vient de recalcifier, avec un mélange identique, sauf qu'il contient du sérum issu de la coagulation antérieure d'un plasma de même composition.

Exp. XXVII. — Du sérum a été obtenu la veille par mélange de 1 cent. cube de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes d'EPCa. D'autre part, au moment même de l'expérience, on prépare un mélange identique. On a donc un sérum et un plasma tout récent, de même composition initiale. Ces deux liquides sont dilués de 9 volumes d'EPCa. Aussi rapidement que possible, on distribue alors ces liquides, à dose de 0,5 cent. cube, dans des tubes où on laisse tomber une goutte de plaquettes. On laisse ce contact entre les liquides et les plaquettes se prolonger pendant des temps variables et exactement mesurés, puis l'on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. On trouve ainsi que le mélange contenant du sérum et où le contact de celui-ci avec les plaquettes a duré 1 min. 45 secondes se prend en bloc en 4 min. 45 secondes, tandis que le mélange renfermant du plasma et où le contact de celui-ci avec les plaquettes a duré 3 min. 10 secondes ne se coagule pas. Celui où le contact plasma-plaquettes s'est prolongé 3 min. 20 secondes se coagule, mais assez lentement (18 minutes); celui où ce contact a

été de 4 minutes se coagule en 5 minutes. Des témoins établissent, bien entendu, que la coagulation ne survient pas en l'absence de plaquettes.

Il semble résulter nettement de cette expérience (inutile de dire que d'autres essais analogues ont donné des résultats concordants) que le plasma recalcifié tout récemment préparé contient non pas le sérozyme actif, mais seulement une substance mère dont celui-ci peut dériver (1). La première phase de la coagulation se signalerait donc par la transformation d'un « prosérozyme » en sérozyme apte à réagir avec le cytozyme. Il se pourrait aussi, à vrai dire, que cette première phase se signalât par la disparition d'une substance antagoniste empêchant le sérozyme d'entrer en activité; d'après cette hypothèse, le sérozyme existerait dans le plasma, mais ne pourrait agir qu'au bout d'un certain temps.

Nous reviendrons d'ailleurs sur ce point à propos de la production de thrombine dans les mélanges de sérum et de peptone.

Les matériaux aux dépens desquels le sérozyme naît dans le plasma sont, comme le sérozyme lui-même, peu résistants au chauffage. Le plasma oxalaté limpide, chauffé à 56 degrés, puis dilué et recalcifié, est incapable, comme le sérum chauffé à cette température, de former de la thrombine en présence de plaquettes.

Exp. XXVIII. — Du plasma oxalaté très limpide est chauffé une demi-heure à 56 degrés; le fibrinogène s'y précipite en flocons. On l'additionne ensuite de 4 volumes d'EPCa. En même temps, on dilue semblablement du plasma identique, sauf qu'il n'a pas été chauffé. Cette seconde dilution se coagule en une heure environ; on obtient ainsi un sérum dont une portion est chauffée une demi-heure à 56 degrés.

On introduit ensuite dans un tube A 0,2 cent. cube du plasma chauffé dilué,

(1) C'est pourquoi nous avons choisi, pour désigner la substance du sérum qui réagit avec les plaquettes, le terme de sérozyme et non celui de plasmozyme. Morawitz, Fuld et Spiro avaient montré que le suc de tissus (cytozyme) réagit avec le sérum pour donner la thrombine. A vrai dire, il s'agit ici de plaquettes, mais nous montrons plus loin que le cytozyme des plaquettes est très vraisemblablement identique à celui des tissus. Or, Fuld et Spiro admettent que le principe du sérum qui réagit avec les tissus préexiste dans le plasma, ils l'appellent plasmozyme; Morawitz, qui partage cette opinion, l'appelle thrombogène. En conséquence, à part cette restriction que, d'après nous, le sérozyme n'existe pas dans le plasma au même état que dans le sérum, les termes de sérozyme, plasmozyme et thrombogène sont synonymes.

dans un tube B même dose du sérum non chauffé dont il vient d'être question, et dans un tube C même dose de ce sérum chauffé. On ajoute partout 0,3 cent. cube d'EPCa, une goutte de plaquettes, puis, 20 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'effectue en 2 minutes dans B; les mélanges A et C sont encore liquides le lendemain.

L'expérience donne le même résultat si, au lieu de chauffer le plasma et de le diluer ensuite, on le dilue d'abord et le chauffe immédiatement après à 56 degrés.

Considérons maintenant plus attentivement la réaction qui s'établit entre les plaquettes et le sérum, c'est-à-dire entre le cytozyme et le sérozyme, pour donner de la thrombine. L'une des substances agit-elle sur l'autre à la façon d'un ferment, ou bien se consomme-t-elle par le fait même qu'elle est entrée en réaction? Par exemple, un volume donné de sérum pourra t-il, après s'être trouvé en contact avec une dose notable de plaquettes, fournir encore de la thrombine lorsqu'on lui fait rencontrer ensuite une dose nouvelle de ces mêmes éléments? Le premier contact ne l'a-t-il pas épuisé de son sérozyme? Le problème du mode de réaction des générateurs de la thrombine a déjà préoccupé les chercheurs; nous rappellerons notamment une expérience due à Nolf : il y a plus de thrombine dans le sérum issu de sang complet que dans celui qui provient de plasma limpide, mais on constate d'autre part que le second sérum est plus apte que le premier à fournir de la thrombine par mélange avec de l'extrait de rate. D'après Nolf, il y a, dans la coagulation du sang complet, consommation de thrombogène, résultant, suivant toute vraisemblance, d'une sécrétion par les leucocytes du sang d'une quantité plus ou moins considérable de thrombozyme qui s'unit pendant la coagulation à l'excès de thrombogène du plasma. L'expérience est intéressante, mais ne présente pas toute la rigueur voulue, car elle est trop complexe, et c'est pourquoi l'interprétation de l'auteur n'est que vraisemblable. Il convient d'éliminer les facteurs étrangers, notamment de mettre hors de cause le fibrinogène et d'éviter ainsi la formation d'un caillot au cours de la réaction; c'est d'autant plus nécessaire que, d'après certains auteurs, particulièrement Nolf, le fibrinogène peut intervenir dans la production de la thrombine. Il y a donc lieu de mettre en présence uniquement les deux facteurs de la réaction, le sérozyme sous forme de sérum, le

cytozyme sous forme de plaquettes, sans mélange d'autres éléments cellulaires. Il faut mettre en œuvre, en d'autres termes, une technique semblable à celle qui sert à démontrer la fixation des anticorps sur les antigènes, des sensibilisatrices sur les globules rouges, par exemple. L'expérience consiste donc à mélanger à une suspension épaisse de plaquettes, une dose modérée de sérum. La formation de thrombine qui s'effectue alors consomme-t-elle le sérozyme? S'il en est ainsi, le sérum séparé le lendemain par centrifugation doit se montrer incapable de former de nouvelle thrombine par contact avec de nouvelles plaquettes. Tel est bien le résultat de l'expérience, dans laquelle on met à profit le fait qu'une thrombine vieillie n'est plus capable de coaguler rapidement le plasma oxalaté lorsqu'on emploie la technique de l'oxalatation séparée :

Exp. XXIX. — Du sérum a été comme d'habitude obtenu la veille par dilution de 1 vol. de plasma limpide dans 4 vol. d'EPCa. On en introduit 0,4 cent. cube dans 2 tubes A et B, et 0,2 cent. cube dans AA et BB. On ajoute aux quatre tubes de l'EPCa (0,6 cent. cube dans A et B, 0,8 cent. cube dans AA et BB) de façon à ce que partout le volume total soit de 1 cent. cube. On laisse tomber ensuite dans B et BB, deux gouttes de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000 et dans A et AA, deux gouttes d'une suspension épaisse de plaquettes dans cette même solution. Le lendemain matin, on centrifuge les tubes qui contiennent des plaquettes et où de la thrombine a pu se produire, et l'on décante les liquides surnageants A et AA.

Chacun des quatre liquides est ensuite distribué dans deux tubes, à dose de 0,45 cent. cube.

Le premier des deux tubes provenant soit de A, soit de B, soit de AA, soit de BB, est additionné d'une goutte de suspension (plus diluée que la précédente) de plaquettes; le second de chaque groupe de deux tubes est additionné d'une goutte de la solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1000. Un quart d'heure plus tard, les huit tubes sont additionnés de 0,1 cent. cube de solution d'oxalate à 0,5 p. 100 (ils sont donc oxalatés à environ 1 p. 1000), puis, 5 minutes après, de 0,5 cent. cube de plasma dilué oxalaté à 1 p. 1000 (obtenu par mélange de 1 p. de plasma oxalaté avec 4 p. de solution physiologique oxalatée à 1 p. 1000). La coagulation survient en 6 minutes dans le tube auquel on vient d'ajouter des plaquettes et renfermant du liquide provenant de B, en 12 minutes dans le tube à plaquettes contenant du liquide de BB.

Les mélanges provenant de A et de AA, avec ou sans addition récente de plaquettes, ne se coagulent qu'au bout de quatre heures environ, les autres tardent encore davantage, ou même ne se coagulent que fort incomplètement.

On voit clairement comment les choses se sont passées : En A et AA, il s'est formé de la thrombine, et celle-ci conservée jusqu'au lendemain ne peut plus provoquer qu'une coagulation lente lorsqu'on l'oxalate à 1 p. 1000 et qu'on la mélange au plasma oxalaté.

Corrélativement à cette formation de thrombine, le sérum contenu dans A

et AA, en réagissant avec les plaquettes, a perdu l'aptitude à réagir avec de nouvelles plaquettes. Dans B et BB, au contraire, pas de plaquettes au début, pas de formation de thrombine; le sérum que ces tubes recèlent est encore parfaitement capable, le lendemain, de réagir avec des plaquettes pour donner une thrombine qui, étant toute fraîche, provoque très rapidement (6 et 12 minutes suivant la dose de sérum) la coagulation du plasma oxalaté.

Il résulte immédiatement de cette expérience que le sérum issu de la coagulation de plasma oxalaté et recalcifié riche en plaquettes, sérum abondamment pourvu de thrombine, doit se montrer peu apte à réagir avec la suspension de plaquettes, pour la raison précisément que le sérozyme a dû être consommé par les plaquettes lors de la coagulation. C'est ce que l'expérience vérifie; il est aisé de comparer de tels sérums avec celui qui dérive de plasma limpide :

Exp. XXX. — On dispose de plasma oxalaté A qu'une centrifugation modérée a débarrassé des éléments cellulaires sauf des plaquettes, et de plasma limpide énergiquement centrifugé B. A une portion de celui-ci, on restitue des plaquettes (par addition d'un peu de suspension épaisse de plaquettes lavées), de façon à obtenir un liquide AA plus trouble que ne l'est le plasma modérément centrifugé. Chacun de ces trois plasmas est additionné de 4 vol. d'EPCa. Les sérums obtenus A, B, AA, sont conservés jusqu'au lendemain, puis, pour chacun d'eux, on prépare quatre dilutions dans l'EPCa, l'une au cinquième, la seconde au dixième, la troisième au vingtième, la quatrième au cinquantième.

On évalue tout d'abord l'énergie coagulante de chacune des trois dilutions au cinquième, vis-à-vis de volume égal de plasma dilué dioxalaté. On trouve que le mélange contenant le sérum A se coagule en 9 heures environ, celui renfermant le sérum AA en 5 heures; celui à base de sérum B est encore liquide après 10 heures, on le trouve coagulé le lendemain. Ce résultat corrobore la notion que les sérums dérivant de plasmas à plaquettes sont plus riches en thrombine.

D'autre part, on répartit dans des tubes 0,5 cent. cube de chacune des dilutions de chacun des trois sérums; on ajoute une goutte de suspension de plaquettes, puis un quart d'heure plus tard on introduit 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Voici les temps de coagulation observés :

DILUTION AU. . .	1/5	1/10	1/20	1/50
De sérum A . . .	1 h. 15 min.	∞ (1)	∞	∞
De sérum AA . .	1 h. 30 min.	∞	∞	∞
De sérum B . . .	3-4 minutes.	3-4 minutes.	3-4 minutes.	Coagulation le lendemain.

(1) Le signe ∞ signifie que le mélange reste indéfiniment liquide.

On voit combien est faible, dans le cas de sérum issu de plasma à plaquettes, le pouvoir de réagir avec ces éléments. Le sérum provenant de la coagulation de sang complet se comporte de même. L'expérience montre toutefois que ce dernier sérum possède encore, mais à un assez faible degré, le pouvoir de former de nouvelle thrombine en présence de plaquettes. La dose de sérozyme que le sang peut livrer est donc un peu supérieure à celle qu'exige la saturation des affinités, pour ce principe actif, des éléments cellulaires sanguins.

Il est un phénomène sur lequel Bordet et Gengou (1) ont insisté et que nos expériences sur les plaquettes permettent d'expliquer clairement. C'est le phénomène dit de « l'excito-production ». Si l'on dilue par 4 volumes d'eau distillée du plasma salé à 5 p. 100, la coagulation s'effectue, on le sait, au bout d'un temps assez notable, une demi-heure par exemple. Mais elle est considérablement accélérée si, immédiatement après dilution, le plasma salé est additionné d'un peu de sérum issu de la coagulation antérieure d'un plasma dilué de même composition. Et, chose curieuse, on trouve que la prompte coagulation ainsi déchaînée n'est pas en réalité passive, c'est-à-dire due uniquement à la thrombine propre au sérum ajouté, car elle se signale par une abondante néoformation de thrombine. Le sérum n'agit pas essentiellement grâce à la thrombine qu'il apporte, mais parce qu'il excite, au sein du plasma et aux dépens des matériaux appartenant à celui-ci, la production de la thrombine qui, sans son intervention, n'aurait apparu que notablement plus tard pour réaliser la coagulation spontanée. Le chauffage à 56 degrés, enlevant au sérum ce pouvoir excito-producteur, supprime sa propriété d'accélérer la coagulation du plasma salé dilué ; d'autre part, ce pouvoir résiste mieux que la thrombine à la conservation à la température ordinaire.

Les recherches de Bordet et Gengou n'avaient pu élucider complètement ce phénomène ; Nolf l'a interprété en attribuant au sérum un rôle thromboplastique analogue à celui que joue le contact avec les corps solides. L'explication exacte en est désormais aisée : Le plasma salé, même bien centrifugé, contient un peu de cytozyme que le sel a extrait des plaquettes. D'autre-

(1) Ces *Annales*, 1904, p. 103.

part, le sérum issu de la coagulation contient un excès de sérozyme. Si donc, à du plasma salé qu'on vient de diluer, on ajoute du sérum, la rencontre s'effectue entre les deux principes, de la thrombine se forme et la coagulation s'opère à bref délai.

Pour faire l'analyse expérimentale du phénomène d'excito-production, il est commode de se servir de plasma oxalaté qui, modérément centrifugé, n'a pas été complètement débarrassé de ses plaquettes et qui (comme le plasma salé) recèle le cytozyme en quantité très suffisante. Le plasma est chauffé à 56 degrés, puis recalcifié; ainsi traité, il est incoagulable pour deux raisons : le chauffage non seulement a altéré le fibrinogène, mais encore, conformément à ce que nous avons vu plus haut, a enlevé au plasma l'aptitude à produire le sérozyme indispensable à la formation de la thrombine. Mais, nous le savons, le cytozyme résiste parfaitement au chauffage. L'addition d'un peu de sérum au plasma chauffé y fera, en conséquence, naître de la thrombine. Le mélange restera fluide, puisque le fibrinogène est altéré, mais se montrera capable de solidifier rapidement le plasma dioxalaté.

Exp. XXXI. — Du plasma oxalaté contenant des plaquettes est chauffé une demi-heure à 55°8. On vérifie tout d'abord que le mélange d'un tel plasma avec 4 vol. d'EPCa non seulement ne se coagule pas, mais encore ne se montre, à aucun moment, capable de coaguler volume égal de plasma dilué dioxalaté.

Cela étant établi, on introduit dans un tube A 0,2 cent. cube de plasma chauffé et 0,8 cent. cube d'EPCa, et dans un tube B 1 cent. cube d'EPCa. On ajoute aux deux tubes 0,2 cent. cube de sérum, obtenu comme d'habitude la veille par dilution de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa. Quarante minutes plus tard, on additionne les deux mélanges de 1 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange A se coagule en quatre minutes, le mélange B est encore liquide le lendemain.

L'expérience donne le même résultat si, au lieu de chauffer d'abord le plasma et de le diluer ensuite, on le chauffe immédiatement après dilution par quatre volumes d'EPCa.

L'expérience telle qu'elle est réalisée ci-dessus permet aussi de démontrer que le plasma oxalaté, lorsqu'il est soigneusement débarrassé des plaquettes par la centrifugation, ne contient que des traces de cytozyme trop faibles pour permettre la formation de thrombine en quantité notable :

Exp. XXXII. — On répète l'expérience ci-dessus, en préparant en outre un mélange C constitué comme suit : Du plasma oxalaté bien dépourvu de

plaquettes, est chauffé une demi-heure à 55°8; on en prend 0,2 cent. cube qu'on additionne de 0,8 cent. cube d'EPCa et de 0,2 cent. cube de sérum. Quarante minutes plus tard, on introduit 1 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange est encore liquide le lendemain.

Les conditions réalisées dans l'expérience XXXI sont l'image suffisamment fidèle de celles qui président au phénomène d'excito-production signalé par Bordet et Gengou, lequel en conséquence n'offre plus rien de mystérieux. Ajoutons que d'après ces auteurs, le contact avec un corps mouillable tel que le verre n'est pas nécessaire à la production de thrombine, sous l'influence du sérum, au sein du plasma. De même, nous pensons que ce contact n'intervient pas dans la réaction entre le sérozyme et le cytozyme des plaquettes.

§ III. — Le cytozyme du suc de muscles.

Comme nous l'avons rappelé, Morawitz a vu que le suc de tissus développe de la thrombine lorsqu'en milieu calcifié on le mélange à du sérum. Ce fait sert de base à la théorie d'après laquelle la thrombine dérive de deux générateurs distincts.

On admettait que le principe actif de l'extrait d'organes (cytozyme) ne résiste pas à l'action des températures élevées. Nous avons constaté le contraire en opérant sur l'extrait de muscles, lequel à vrai dire devient presque inactif lorsqu'on le chauffe à 120 degrés, mais garde ses propriétés lorsqu'on l'expose pendant un quart d'heure à la température de 100 degrés. Il se comporte donc comme la suspension de plaquettes, en ce sens que, même chauffé, il accélère la coagulation du plasma oxalaté limpide que l'on vient de recalcifier, et d'autre part donne naissance à de la thrombine lorsqu'on l'additionne de sérum.

Exp. XXXIII. — Un fragment de muscle de lapin est broyé et additionné de solution physiologique contenant 0,5 p. 1.000 d'oxalate. La suspension très trouble ainsi obtenue est passée sur toile métallique à mailles fines. Une portion du liquide est conservée telle quelle, une autre est chauffée le lendemain pendant un quart d'heure à 100 degrés, en même temps qu'une suspension de plaquettes de lapin et un extrait de muscle de bœuf préparé comme l'a été l'extrait de muscle de lapin.

On verse dans huit tubes 0,3 cent. cube de plasma oxalaté bien limpide et l'on ajoute 1,2 cent. cube d'EPCa. Immédiatement après, on laisse tomber

dans l'un des tubes (a) une goutte de suspension de plaquettes non chauffée, dans un second tube une goutte de plaquettes chauffée (b). De même, quatre tubes reçoivent soit de l'extrait non chauffé de muscle de lapin (c), soit cet extrait chauffé (d), soit de l'extrait de muscle de bœuf non chauffé (e), soit ce même extrait chauffé (f). Aux deux tubes restants g et h, on n'ajoute rien. Résultat : dans g et h la coagulation s'opère en 22 à 26 minutes (1), dans *a* en 6', dans *b* en 7', dans *c* en 4', dans *d* en 3', dans *e* en 14', dans *f* en 13'.

On constate, soit dit en passant, que le muscle de bœuf est nettement inférieur au muscle de lapin au point de vue de l'accélération imprimée à la coagulation du plasma oxalaté recalcifié ; il agit toutefois nettement.

Exp. XXXIV. — Cinq tubes contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum obtenu comme d'habitude la veille par dilution de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa, Au tube 1 on n'ajoute rien; dans les tubes 2, 3, 4, 5, on laisse tomber une goutte, respectivement de plaquettes non chauffées, de plaquettes chauffées à 100 degrés, d'extrait non chauffé de muscle de lapin, de ce même extrait chauffé à 100 degrés. Un quart d'heure plus tard, on ajoute aux mélanges 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Résultat : 1 est encore liquide le lendemain ; la coagulation s'opère en 2 à 3 minutes dans les autres tubes.

Nous avons vu plus haut que le chauffage vers 56 degrés enlève au sérum (ou au plasma) le pouvoir de réagir avec les plaquettes pour donner de la thrombine. Il en est de même pour ce qui concerne la réaction avec le suc de muscles (2) :

Exp. XXXV. — On établit tout d'abord qu'un mélange de 0,3 cent. cube d'EPCa et de 0,2 cent. cube de sérum non chauffé, auquel on ajoute volume égal (0,5 cent. cube) de plasma dilué dioxalaté, ne se coagule pas (il est encore liquide le lendemain). Il en est de même, cela va de soi, d'un mélange semblable, sauf que le sérum non chauffé y est remplacé par 0,2 cent. cube de ce même sérum préalablement chauffé une demi-heure à 55°4.

Cela étant établi, on verse dans six tubes 0,3 cent. cube d'EPCa et 0,2 cent. cube de sérum, soit non chauffé (A, B, C), soit qui a été chauffé une demi-heure à 55°4 (D, E, F). On laisse tomber en A et D une goutte de plaquettes, en B et E, une goutte d'extrait de muscles de lapin, en C et F une goutte

(1) Ce temps de coagulation du plasma limpide dilué et recalcifié est relativement court. Cela tient à ce que la température du laboratoire était fort élevée (23°) le jour où cette expérience a été réalisée.

(2) Nous ne sommes donc pas d'accord avec les auteurs (Blaizot notamment) d'après lesquels le plasma oxalaté chauffé à 56 degrés se comporte comme s'il contenait encore du thrombogène. On le sait, le thrombogène correspond à notre sérozyme. Or, nous avons constaté que si l'on ajoute à 0,2 cent. cube de plasma oxalaté (chauffé au préalable une demi-heure à 55°8) 0,8 cent. cube d'EPCa et un peu d'extrait de muscle, il ne se forme pas de thrombine dans le mélange.

d'extrait de muscle de bœuf, puis, 20 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en une et demie à deux et demie minutes dans les tubes A, B, C ; les mélanges D, E, F sont encore liquides le lendemain.

Dans les expériences qui précèdent, l'extrait de muscle se comporte exactement comme la suspension de plaquettes. Le cytozyme de l'extrait est-il entièrement identique à celui des plaquettes ? S'il en est ainsi, on doit prévoir que du sérum dépouillé de son sérozyme par contact préalable avec des plaquettes, se montrera inactif non seulement à l'égard de nouvelles plaquettes (ce que nous savons déjà), mais aussi vis-à-vis d'extrait de muscle, et qu'inversement le traitement par le suc de muscle doit enlever au sérum son aptitude à réagir avec les plaquettes. C'est bien dans ce sens que l'expérience répond :

Exp. XXXVI. — Trois tubes A, B, C contiennent 0,9 cent. cube d'EPCa et 0,6 cent. cube de sérum. On ajoute à A trois gouttes de suspension assez épaisse de plaquettes lavées, à B même quantité d'extrait de muscle de lapin, à C même dose de solution physiologique oxalatée à 5 p. 1 000 (comme le sont la suspension de plaquettes et l'extrait). Le lendemain, on centrifuge A et B et décante les liquides surnageants. Chacun des liquides A, B, C est alors réparti, à dose de 0,45 cent. cube dans trois tubes qu'on additionne respectivement d'une goutte, soit de plaquettes, soit d'extrait de muscle, soit de solution physiologique oxalatée à 0,5 p. 1.000. Vingt minutes plus tard, on oxalate les mélanges à 1 p. 1.000 (par addition de 0,1 cent. cube d'oxalate à 0,5 p. 100), et au bout de dix minutes, on les additionne de 0,5 cent. cube de plasma dilué oxalaté à 1 pour 1.000 (obtenu par mélange de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 volumes de solution physiologique oxalatée à 1 pour 1.000).

Aucun des mélanges renfermant le liquide A ou le liquide B ne se coagule rapidement ; ils se solidifient au bout de trois à quatre heures seulement, sous l'influence de la thrombine qui s'y est produite la veille et dont l'énergie s'est beaucoup affaiblie par la conservation. L'addition récente d'une goutte de plaquettes ou d'une goutte d'extrait n'y a déterminé aucune apparition de thrombine, ce qui démontre que le sérozyme a disparu grâce au premier contact, réalisé le jour précédent, soit avec les plaquettes, soit avec l'extrait. Au contraire, le sérozyme s'est maintenu intact dans le liquide C. En effet, les deux mélanges contenant ce liquide, et qui viennent de recevoir soit une goutte de plaquettes, soit une goutte d'extrait, se coagulent en 4-5 minutes. L'expérience montre qu'un sérum épuisé

par des plaquettes est devenu inactif à l'égard d'extrait, aussi bien qu'à l'égard de plaquettes, et vice-versa.

Dans le même ordre d'idées, nous avons éprouvé vis-à-vis de l'extrait de muscle, les sérums dont il est question dans l'expérience XXX, et qui, provenant de plasmas riches en plaquettes, ne possédaient, comparativement à du sérum issu de plasma limpide, qu'une aptitude médiocre à développer de la thrombine en présence de plaquettes. On trouve que ces sérums se montrent également peu aptes à réagir avec l'extrait de muscle :

Exp. XXXVII. — On reprend les sérums A, B, AA de l'expérience XXX, et qui proviennent respectivement de deux plasmas riches en plaquettes (A,AA) ou d'un plasma limpide (B). On dilue ces sérums au dixième (dans EPCa) : chacune de ces dilutions est introduite à dose de 0,5 cent. cube dans trois tubes A, AA, B ; on ajoute une goutte d'extrait de muscle, et vingt minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. A est encore liquide après 4 heures (on le trouve coagulé le lendemain) ; B se coagule en 4 minutes, A A en 4 heures environ.

Les faits que nous venons de citer autorisent, nous semble-t-il, à identifier le principe actif des plaquettes avec le principe correspondant de l'extrait de muscle ; ces deux principes peuvent être confondus sous la dénomination commune de cytozyme.

Spécificité d'action du suc de tissus. — D'après les auteurs qui se sont occupés de cette question, c'est une loi assez générale que le suc de tissu venant d'une espèce animale déterminée se montre spécialement actif à l'égard du plasma provenant de la même espèce ou d'une espèce voisine. Delezenne avait observé par exemple que le plasma d'oie se coagule plus vite sous l'influence d'extrait de tissu d'oie que sous l'action d'extrait de tissu de mammifères. C'est particulièrement à L. Loeb que l'on doit de nombreux renseignements concernant l'adaptation spécifique des sucs de tissus aux plasmas d'espèce identique. Hewlett, Fuld, Nolf, Muraschew, ont contribué aussi à l'étude de cette question, laquelle est assez complexe, car à côté de la spécificité possible du cytozyme (c'est-à-dire de son aptitude plus ou moins grande à réagir avec les sérozymes de même espèce ou d'espèces différentes) intervient aussi la spécificité éventuelle de la thrombine née de cette réaction (c'est-à-dire

son aptitude plus ou moins marquée à provoquer la prise en caillot de tel ou tel fibrinogène). Il semble bien acquis, d'après les recherches de Bordet et Gengou sur les sérums anticoagulants, que les thrombines provenant d'espèces animales différentes ne sont pas chimiquement tout à fait identiques les unes aux autres, ce qui ne signifie nullement qu'elles soient incapables de coaguler des fibrinogènes venant d'espèces animales autres que celles dont elles-mêmes dérivent. La spécificité d'action des thrombines ne semble pas, en effet, être très stricte; ainsi, du sérum de poule provoque sans difficulté la coagulation de plasma oxalaté de lapin.

Mais l'expérience permet des combinaisons telles, qu'*a priori* il peut être assez difficile de dire à quelle espèce animale appartient la thrombine que l'on étudie. Trois espèces animales en effet peuvent intervenir dans une seule et même coagulation. Nous pouvons évidemment faire réagir un sérum d'espèce A sur des plaquettes ou du suc de tissu d'espèce B, et éprouver ensuite l'énergie coagulante du mélange sur un plasma d'espèce C. Dans de pareilles conditions, la thrombine en jeu appartient-elle à l'espèce A ou à l'espèce B? S'identifie-t-elle avec l'une ou l'autre des thrombines qu'on obtiendrait soit en mélangeant du suc de A avec du sérum de A, soit en ajoutant à du sérum de B, du suc de B? Des recherches dans ce sens jetteraient sans doute plus de lumière sur le mécanisme intime de la réaction qui s'établit entre le cytozyme et le sérozyme; peut-être aurait-on recours utilement, à ce propos, aux sérums anticoagulants spécifiques obtenus par immunisation contre l'un ou l'autre des principes actifs.

Quoi qu'il en soit, réservant de tels essais pour une étude ultérieure, nous nous bornerons aujourd'hui à énumérer sans commentaires quelques constatations recueillies au cours de nos expériences :

Du plasma de poule qui se coagule sous l'influence de suc de muscle de poule donne un sérum qui coagule aisément le plasma oxalaté de lapin. Le sérum de cobaye fournit une thrombine très active (à l'égard de plasma de lapin) lorsqu'on le mélange à des plaquettes de lapin. Le plasma oxalaté de lapin se coagule aisément sous l'influence d'un mélange de sérum de lapin avec du muscle de bœuf ou d'un mélange de sérum de

bœuf, soit avec des plaquettes de lapin, soit avec du muscle de bœuf. Mais, chose assez curieuse, le mélange de sérum de lapin et de plaquettes de lapin, ou bien encore le mélange de sérum de lapin et de muscle de bœuf, lesquels coagulent facilement le plasma dioxalaté de lapin, ne coagulent que très lentement et très péniblement le plasma dioxalaté de bœuf. Celui-ci pourtant se coagule très vite sous l'influence d'un mélange de sérum de bœuf avec des plaquettes de lapin, ou bien encore d'un mélange de sérum de bœuf avec du muscle de bœuf. Nous avons vu plus haut que le muscle de bœuf accélère assez nettement la coagulation du plasma oxalaté de lapin que l'on vient de recalcifier.

§ IV. — Le cytozyme de la peptone.

Le plasma peptoné spontanément incoagulable qu'on obtient par saignée des animaux auxquels on vient d'injecter de la peptone a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. Nous ne comptons pas le soumettre ici à une étude approfondie ; nous nous bornerons à signaler quelques faits dont les recherches ultérieures pourront utilement tenir compte.

L'effet anticoagulant des injections intraveineuses de peptone s'explique par une réaction de l'organisme à laquelle le foie semble bien prendre une part prépondérante. Mais quelle est la substance active de la peptone ? Dérive-t-elle de la digestion pepsique de la viande ou bien préexiste-t-elle dans celle-ci avant tout contact avec le ferment digestif? Cette seconde hypothèse peut *a priori* sembler assez plausible en raison de ce fait bien connu (Conradi, Uhlenhuth et Handel, Dold, etc...) que l'injection intravasculaire d'extrait de tissus n'ayant subi aucune influence altérante telle que celle de la pepsine, peut, tout comme l'injection de peptone, déterminer l'incoagulabilité du sang.

Pour juger de cette question, il n'est pas inutile de savoir que la peptone, ainsi que nous allons le démontrer, partage avec le suc de muscle la propriété, importante à considérer dans l'étude de la coagulation, de produire de la thrombine en présence de sérum.

A vrai dire, l'aptitude de la peptone à réagir avec le sérum

pour former la thrombine ne peut être mise en évidence qu'à une condition : la solution peptonée doit avoir été au préalable additionnée d'alcali jusqu'à réaction exactement neutre ou légèrement alcaline au papier de tournesol. La peptone du commerce est très souvent acide et cette acidité s'oppose à la formation de thrombine.

Exp. XXXVIII. — Nous employons couramment pour les usages bactériologiques une peptone de fort bonne qualité, préparée exclusivement au moyen de viande de bœuf (peptone de l'hôpital de Diest, Belgique). On dissout à froid 10 grammes de cette peptone dans 30 cent. cubes d'eau distillée. Une partie de la solution est gardée telle quelle, le reste est additionné de solution de KOH à 10 p. 100 jusqu'à réaction neutre ou très légèrement alcaline au tournesol (1).

On verse dans deux tubes A et B 0,5 cent. cube d'EPCa ; dans trois tubes C, D, E, 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum (obtenu par coagulation de plasma oxalaté limpide de lapin additionné de 4 volumes d'EPCa). On laisse tomber dans A et C une goutte de solution de peptone non neutralisée, dans B et D une goutte de cette même solution neutralisée. Vingt minutes plus tard, on ajoute à tous les tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange D se coagule en trois minutes ; C et E, liquides après trois heures, sont trouvés coagulés le lendemain ; A et B restent indéfiniment liquides.

On le voit, la peptone ne possède par elle-même aucun pouvoir coagulant ; comme pour le suc de muscle, le concours du sérum est nécessaire à l'apparition de la thrombine (2). Que, d'autre part, même en présence de sérum, l'acidité de la peptone s'oppose à la production de thrombine, on peut le démontrer d'une manière indiscutable : nous savons que la thrombine apparaît en abondance dans le mélange de sérum et de suc de muscle ; or, elle ne s'y produit pas si un tel mélange contient en outre de la solution non neutralisée de peptone. Par contre, cette solution, qui contrarie la formation de la thrombine, ne met pas obstacle au pouvoir coagulant de ce principe actif :

Exp. XXXIX. — Trois tubes A, B, C, contiennent 0,35 cent. cube d'EPCa et 0,15 cent. cube de sérum ; on laisse tomber dans B une goutte de

(1) Il faut à peu près 0.1 cent. cube de cette solution pour 1 gramme de peptone sèche. La solution de peptone ne renferme qu'une dose modérée de Ca ; elle précipite faiblement par l'oxalate.

(2) Les traces de KOH pouvant exister dans la solution de peptone alcalinisée, ne participent pas à la formation de thrombine en présence de sérum, ainsi qu'on le démontre en constituant des mélanges de sérum et de solutions très diluées (bleuissant légèrement le papier de tournesol) de KOH, et en ajoutant ensuite à ces mélanges du plasma dioxalaté.

la solution non neutralisée de peptone, puis dans les trois tubes une goutte d'extrait de muscle de bœuf. Une demi-heure plus tard, on ajoute à C une goutte de peptone, puis immédiatement après, aux trois tubes, 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Les mélanges A et C se coagulent en quatre minutes. Dans B, une coagulation lâche et incomplète apparaît après deux heures seulement.

L'idée fort naturelle que l'aptitude de la peptone à réagir avec le sérum résulte simplement de ce qu'il s'est maintenu en elle du cytozyme propre à la viande qui a servi à sa préparation, trouve une confirmation dans le fait que, comme l'extrait de muscle de bœuf, la peptone se montre encore parfaitement active après chauffage à 100 degrés pendant un quart d'heure. Ajoutons qu'il n'est pas nécessaire, pour obtenir de la thrombine par addition de sérum, d'employer des solutions de peptone aussi concentrées que celle dont nous nous sommes servis dans les expériences précédentes : des solutions cinq ou dix fois plus étendues conviennent encore fort bien.

Exp. XL. — Trois tubes A, B, C, contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum. On ajoute à B une goutte de solution neutralisée de peptone (cinq fois plus diluée que celle des expériences précédentes), qui a été chauffée un quart d'heure à 100 degrés ; à C, une goutte d'extrait de muscle de bœuf également chauffé à 100 degrés. Vingt minutes plus tard, on ajoute aux trois tubes 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. La coagulation s'opère en six minutes dans B, en quatre minutes et demie dans C ; A ne se coagule que le lendemain.

Nous avons vu, au cours de nos expériences sur les plaquettes, que le sérozyme abondant dans le sérum ne se rencontre pas dans le plasma que l'on vient de diluer et de recalcifier. Ce fait se constate encore de la manière la plus nette lorsqu'on emploie la peptone comme réactif du sérozyme :

Exp. XLI. — On a du sérum obtenu par dilution de 1 vol. de plasma oxalaté limpide avec 4 vol. d'EPCa. D'autre part, immédiatement avant l'expérience, on prépare une dilution identique (plasma dilué tout récent); trois tubes A, B, C renfermant 0,4 cent. cube d'EPCa, reçoivent 0,1 cent. cube de sérum ; deux tubes D, E, contenant aussi 0,4 cent. cube d'EPCa, reçoivent 0,1 cent. cube de plasma dilué qu'on vient d'obtenir. Dans les tubes B, C, D, E, on laisse tomber une goutte de solution neutralisée de peptone, puis, après 3 minutes pour les tubes A et B, après 6 minutes pour le tube C, après 4 minutes pour le tube D, après 7 minutes pour le tube E, on ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté. Le mélange B se coagule au bout de 8 minutes, le mélange C au bout de 5. Le mélange A ne se coagule que le lendemain, les mélanges D et E restent indéfiniment liquides.

La production de thrombine dans le mélange sérum-peptone est assez rapide : elle se constate déjà après trois minutes de contact ; cependant elle ne semble atteindre son maximum qu'au bout d'un temps un peu plus long :

Exp. XLII. — Trois tubes renfermant 0,4 cent. cube d'EPCa et 0,1 cent. cube de sérum sont additionnés d'une goutte de solution de peptone. On ajoute 0,5 cent. cube de plasma dilué dioxalaté après 3 minutes pour le tube A, après 7 minutes pour le tube B, après 15 minutes pour le tube C. On constate que A se coagule en 8 1/2, B en 5 1/2, C en 4 minutes.

La peptone ne nous a point paru hâter d'une manière bien notable la coagulation de plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier. Il est nécessaire que le sérozyme prenne naissance tout d'abord dans le plasma avant que la production de thrombine aux dépens de ce sérozyme et de la peptone puisse s'effectuer. Il faut tenir compte, d'autre part, que la peptone employée est d'origine bovine et que le muscle de bœuf lui-même se montre nettement moins actif, au point de vue de l'accélération de la coagulation du plasma de lapin, que le muscle de lapin. Il serait intéressant, mais c'est une expérience que nous n'avons pas réalisée, d'étudier une peptone fabriquée au moyen de viande de lapin.

Mais, ainsi qu'il faut s'y attendre, la coagulation du plasma dilué recalcifié est considérablement accélérée quand on l'additionne à la fois d'un peu de sérozyme sous forme de sérum, et de peptone. Elle s'opère dans ces conditions beaucoup plus vite que si le plasma avait été additionné uniquement de sérum :

Exp. XLIII. — On peut opérer de deux façons : ou bien faire réagir tout d'abord le sérum sur la peptone et ajouter ensuite le plasma dilué recalcifié ; ou bien introduire successivement, dans ce plasma, le sérum et la peptone. L'expérience comprend des témoins où le plasma dilué ne reçoit aucune addition, ou est additionné exclusivement soit de sérum, soit de peptone.

Le plasma dilué recalcifié (1 vol. plasma oxalaté limpide, 4 vol. d'EPCa) est préparé immédiatement avant l'expérience. Cinq tubes contiennent 0,4 cent. cube d'EPCa. Au tube A on ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de solution neutralisée de peptone, puis 4 minutes 1/2 plus tard, 0,5 cent. cube du plasma que l'on vient de préparer. La coagulation survient dans ce mélange au bout de 9 minutes. Au tube B on ajoute d'abord 0,5 cent. cube de plasma récent, puis une goutte de peptone et 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation demande 11 à 12 minutes. Les tubes C, D, E reçoivent 0,5 cent. cube du plasma récent, mais à C l'on

n'ajoute rien, tandis qu'à D on ajoute une goutte de peptone, et à E 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation exige 74 minutes dans C, 71 minutes dans D (on voit que l'addition de peptone ne hâte guère la coagulation), 48 minutes dans E. Celui-ci, remarquons-le, ne se coagule pas très vite; il contient pourtant du sérum, mais ce sérum, nous le savons, est très pauvre en thrombine parce qu'il vient de plasma dépourvu de plaquettes; le sérozyme qu'il renferme reste quasi inutile, car le plasma récent, privé de ses plaquettes, ne contient que des traces de cytozyme.

Les expériences de ce genre sont plus démonstratives lorsqu'on les réalise avec du plasma qui, en même temps qu'on le dilue et le recalcifie, est mis au contact de SO^4Ba, et est ensuite centrifugé. Nous le savons, un tel plasma est incapable de se coaguler spontanément.

Exp. XLIV. — A 2 cent. cubes d'EPCa, on mélange quinze gouttes d'une suspension assez épaisse de SO^4Ba bien lavé, et 0,5 cent. cube de plasma oxalaté limpide. Après trois heures, on centrifuge et décante le liquide surnageant (plasma baryté).

Quatre tubes renferment 0,4 cent. cube d'EPCa. Au tube A on ajoute 0,1 cent. cube de sérum et une goutte de peptone, puis 9 minutes plus tard, 0,5 cent. cube de plasma baryté. La coagulation survient dans ce mélange au bout de 8 minutes. Au tube B, on ajoute d'abord 0,5 cent. cube de plasma baryté, puis une goutte de peptone et 0,1 cent. cube de sérum. La coagulation demande 16 minutes. Le tube C reçoit une goutte de peptone; ce mélange ne se coagule pas. Le tube D reçoit 0,1 cent. cube de sérum; la coagulation s'y effectue seulement au bout de plusieurs heures.

Cette expérience démontre que par elle-même, sans le secours du sérum, la peptone est impuissante, même en milieu calcifié, à faire coaguler le fibrinogène. Il en est de même, nous le savons, des plaquettes.

Conclusions.

La coagulation comporte une succession de phénomènes, qui aboutit à la formation de la thrombine, dont l'apparition au sein du plasma a pour conséquence immédiate la prise en caillot. Il paraît bien établi que l'agent direct de la coagulation, la thrombine, naît de la réaction mutuelle du sérozyme et du cytozyme. Celui-ci est fourni par les cellules, en particulier par les plaquettes. Mais d'où vient le sérozyme? L'expérience tend à faire admettre qu'au début du processus il n'existe pas comme tel dans le plasma, ou tout au moins ne peut y entrer en réaction. Grâce à quel mécanisme se produit-il ou bien peut-il agir à un moment donné? On l'ignore. C'est donc la phase initiale de la coagulation qui se montre encore la plus mystérieuse. Elle

se signale par l'apparition du sérozyme, et c'est à ce moment aussi que se manifeste l'influence si décisive et si obscure encore du contact avec les corps étrangers. Les cellules et notamment les plaquettes se bornent-elles à fournir le cytozyme ou bien interviennent-elles aussi d'une façon qu'on ne saurait préciser actuellement, dans la réaction dont le sérozyme résulte ? Quel est exactement le rôle du contact, à quel moment précis doit-il se manifester? C'est sûrement au début du processus, car le contact n'est pas nécessaire à la réaction qui s'établit entre le cytozyme et le sérozyme. On ne pourra répondre à ces questions avant d'avoir soumis à des recherches plus approfondies les phénomènes intimes, et notamment la phase initiale, de la coagulation. Nous nous bornerons donc aujourd'hui à énumérer les constatations principales consignées dans ce mémoire :

1° La thrombine, surtout quand elle est âgée, est affaiblie par la précipitation des sels calciques propres au liquide qui la contient. Un procédé sensible pour la mettre en évidence dans un liquide consiste à ne pas décalcifier tout d'abord celui-ci, mais à l'additionner de volume égal de plasma oxalaté à 2 p. 1.000;

2° En se coagulant, les plasmas débarrassés de plaquettes donnent un sérum pauvre en thrombine ; celle-ci est abondante au contraire dans les sérums issus de plasmas à plaquettes, dont, on le sait, la coagulation s'opère rapidement ;

3° La diffusion du principe actif des plaquettes (cytozyme) s'opère assez lentement dans le plasma ou la solution physiologique, plus rapidement dans les solutions concentrées de NaCl; ce fait explique que le plasma salé, même bien centrifugé, fournit un sérum riche en thrombine lorsqu'on en provoque la coagulation par addition d'eau distillée;

4° La cytozyme des plaquettes résiste au chauffage à 100 degrés; on peut obtenir des extraits de plaquettes stérilisés à 100 degrés, et qui accélèrent considérablement la coagulation;

5° Le rôle des plaquettes dans la coagulation est beaucoup plus important que celui des leucocytes. C'est pourquoi les exsudats péritonéaux très riches en leucocytes se coagulent plus vite lorsqu'on les additionne de plaquettes. Par l'action combinée de l'eau distillée et de CO^2, on peut obtenir un plasma spontanément incoagulable, mais coagulable par addition de pla-

quettes. Il est fort vraisemblable que si les mammifères ne possédaient pas de plaquettes, leur sang se comporterait comme le sang des oiseaux, c'est-à-dire ne serait que lentement coagulable même en milieu calcifié, et fournirait aussi, par centrifugation rapide, un plasma à peu près incoagulable spontanément ;

6° En présence de sérum, les plaquettes (cytozyme) donnent de la thrombine. Cette réaction exige la présence de sels calciques solubles. On peut appeler *sérozyme* la substance active du sérum ;

7° Comme l'oxalate, le citrate empêche cette réaction, mais ne s'oppose pas à l'influence coagulante de la thrombine lorsque celle-ci a pu se produire. La forte concentration saline met obstacle aussi à la réaction ; celle-ci d'autre part peut s'effectuer dans un milieu de concentration saline faible ;

8° Il suffit d'une quantité relativement faible de sérozyme et de cytozyme pour que, la réaction s'établissant, le liquide acquière une énergie coagulante très manifeste ;

9° La réaction entre le cytozyme et le sérozyme est rapide, mais pas instantanée ;

10° La thrombine issue de la réaction entre les plaquettes et le sérum ne peut coaguler qu'une dose déterminée de plasma oxalaté ;

11° Le sérozyme se détruit par le chauffage à 55 degrés. Il est absorbé par le précipité de SO^4Ba, lequel enlève d'ailleurs au plasma le pouvoir d'engendrer du sérozyme. Il n'est pas absorbable par les globules sensibilisés ;

12° Le cytozyme des plaquettes intervient plus activement que celui des leucocytes dans la formation de la thrombine ;

13° Les extraits stériles de plaquettes (obtenus par chauffage à 100 degrés et centrifugation) conservent longtemps leur pouvoir de produire de la thrombine en présence de sérum ;

14° Le sérozyme, qu'on trouve en abondance dans le sérum, ne semble pas exister encore (au moins fonctionnellement) dans le plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier. L'un des phénomènes initiaux de la coagulation consiste donc, suivant toute vraisemblance, dans l'apparition au sein de liquide, de l'aptitude à réagir avec le cytozyme pour donner de la thrombine ;

15° Chauffé à 56 degrés, le plasma perd l'aptitude à produire du sérozyme;

16° Du sérum qui s'est trouvé en contact avec des plaquettes a perdu, par ce fait même, le pouvoir de réagir avec de nouvelles plaquettes. Le sérozyme se consomme donc en réagissant avec le cytozyme. C'est pourquoi le sérum provenant de plasma contenant des plaquettes (ou de sang complet) est moins apte à réagir avec des plaquettes que ne l'est le sérum issu de plasma débarrassé de ces éléments;

17° Le phénomène « d'excitoproduction » décrit par Bordet et Gengou (production rapide, par addition de sérum, de thrombine au sein du plasma salé dilué) s'explique parce que le sérozyme du sérum réagit avec le cytozyme du plasma pour engendrer de la thrombine;

18° Le cytozyme du suc de muscles résiste comme celui des plaquettes au chauffage à 100 degrés;

19° Les expériences où l'on provoque la coagulation du plasma oxalaté par une thrombine née du mélange de plaquettes ou suc de tissus avec du sérum, conviennent particulièrement à l'étude de la spécificité des principes actifs de la coagulation;

20° La peptone contient du cytozyme provenant de la viande qui a servi à sa fabrication. Même si elle a été chauffée au préalable à 100 degrés, la solution de peptone donne de la thrombine lorsqu'on y ajoute du sérum. Cette réaction exige que l'acidité de la peptone ait été neutralisée. L'acidité en effet s'oppose à la formation de thrombine, mais non à l'influence coagulante de celle-ci;

21° Par elle-même, sans le secours du sérum, la peptone, pas plus que les plaquettes ou le suc de muscle, ne convertit le fibrinogène en fibrine, même si le liquide ambiant contient des sels calciques, à condition bien entendu que celui-ci soit exempt de sérozyme ou des matières capables d'engendrer ce principe. Tel est le cas du plasma baryté, dont l'emploi est utile dans beaucoup d'expériences sur la coagulation;

22° Le sérozyme qui, dans le sérum, agit sur la peptone n'existe pas encore dans le plasma oxalaté que l'on vient de diluer et de recalcifier.

SUR L'EXTRAORDINAIRE SENSIBILITÉ
DE L'ASPERGILLUS NIGER
VIS-A-VIS DU MANGANÈSE

par M. Gabriel BERTRAND

Les recherches que j'ai publiées antérieurement sur la laccase et sur l'emploi du manganèse comme engrais ont déjà laissé entrevoir l'extrême petitesse de la proportion de manganèse qui suffit à impressionner les végétaux. Les expériences que je vais décrire préciseront cette notion et lui donneront, en même temps, une valeur inattendue, je pourrais même dire surprenante. Grâce, en effet, à une technique sévère et à des précautions minutieuses, je suis parvenu à obtenir, d'une manière constante, en opérant avec l'*Aspergillus niger*, des augmentations de récolte facilement appréciables par l'addition au milieu de culture d'une quantité aussi extraordinairement petite qu'un milliardième et même un décimilliardème de manganèse, soit une proportion d'un milligramme seulement de métal dans 10.000 litres de liquide nutritif.

Une des grandes difficultés à résoudre pour atteindre ce résultat a été la purification des substances organiques ou minérales destinées à l'alimentation de l'*Aspergillus*. Déjà, dans les expériences que j'ai faites avec Javillier, en vue de savoir ce que deviennent les récoltes du champignon sous l'influence combinée du manganèse et du zinc (1), nous avions éprouvé quelque peine à préparer un milieu de culture dans lequel il n'y eût guère plus de 1/500 de milligramme de manganèse par litre. Or, c'est là une proportion d'impureté relativement énorme par rapport à celle qu'il me fallait éliminer des substances destinées à la préparation du milieu nutritif.

J'ai d'abord essayé la méthode des cristallisations successives. Même en consentant à de grosses pertes, cette méthode

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et p. 515, 1912.

ne m'a pas toujours conduit au but. J'arrivais bien, après un nombre plus ou moins grand de cristallisations, à obtenir des substances dont une dose relativement élevée ne donnait plus la réaction cependant très sensible du manganèse par le procédé que j'ai décrit (1), mais lorsque j'analysais les cendres de l'*Aspergillus* développé sur un milieu préparé avec ces substances, je pouvais encore trouver des traces du métal que la plante avait en quelque sorte concentrées dans ses tissus. La méthode des cristallisations successives n'a bien réussi que pour le sulfate ferrico-ammonique : le sulfate de manganèse, qui se trouve dans la solution du sel au moment de la préparation, ne pouvant remplacer ni le fer trivalent, ni l'ammonium monovalent, reste dans les eaux mères dès la première cristallisation. Je n'ai employé le sel double, toutefois, qu'après trois cristallisations.

Pour la plupart des autres substances, j'ai éliminé le manganèse à l'état de bioxyde en ajoutant à la solution, rendue légèrement alcaline par l'ammoniaque, un peu d'eau oxygénée pure. Étant donnée la pureté déjà très grande des substances sur lesquelles j'opérais, le bioxyde ne s'est pas produit d'une manière visible. J'en ai assuré la complète séparation en l'entraînant par collage à la surface d'un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien obtenu par addition au liquide d'une molécule de phosphate diammonique et d'une molécule de sulfate de magnésium (2). Après quelques heures de repos le liquide a été filtré et concentré dans une capsule de platine.

Cette méthode chimique a été appliquée aussi bien au saccharose qu'au nitrate, au phosphate et au sulfate d'ammonium, au carbonate de potassium, au sulfate de zinc et à celui de magnésium. Dans la solution de ce dernier, après avoir ajouté quelques gouttes d'ammoniaque et l'eau oxygénée, je n'ai introduit, pour la précipitation, comme cela se comprend,

(1) *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 361, 1911.

(2) Par exemple, 0 gr. 66 de phosphate et 1 gr. 23 de sulfate pour un demi-litre environ de solution à 15-20 p. 100 de la substance à purifier. Le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien, dissous et oxydé par le persulfate de potassium en présence de nitrate d'argent, permet de doser le manganèse qui se trouvait dans la substance. C'est ainsi que j'ai trouvé les poids de manganèse suivants dans un kilogramme de diverses substances parmi les plus pures du commerce : 0 milligr. 45 pour le phosphate d'ammonium, 2 milligr. pour le sulfate de zinc, 25 milligr. pour le chlorure de sodium, etc.

que du phosphate d'ammonium. Pour obtenir la cristallisation du saccharose, j'ai poussé la concentration jusqu'à ce que le sirop contienne un peu plus des deux tiers de son poids de sucre; je l'ai mélangé alors avec son volume d'alcool à 95 degrés redistillé et je l'ai abandonné, après amorçage, dans un matras bouché. Celui-ci a été brisé lorsque les cristaux n'augmentaient plus. Quant aux sels, après les avoir essorés, ils ont été lavés et recristallisés en se servant d'eau pure, redistillée dans le vide avec un appareil en verre.

A côté du saccharose, j'ai utilisé l'acide succinique comme substance alimentaire carbonée. La purification de cet acide a été obtenue par une série de cristallisations, d'abord dans l'acide sulfurique à 5 p. 100, puis dans l'eau seule (1).

Il est à peine utile de dire qu'il m'a fallu prendre les précautions les plus minutieuses au cours des expériences pour éviter toutes contaminations par le manganèse, me mettre par conséquent à l'abri des poussières, ne pas chauffer les solutions de substances pures dans des vases de verre, mais de quartz ou de platine, etc.

Les cultures ont été faites dans des matras cylindro-coniques à large col, de 750 cent. cubes de capacité, en quartz fondu (2). Chaque matras renfermait en général :

Eau pure, redistillée dans le vide.	200 grammes.
Carbonate de potassium.	0 gr. 08
Nitrate d'ammonium.	0 gr. 60
Phosphate d'ammonium	0 gr. 08
Sulfate d'ammonium.	0 gr. 04
Sulfate de magnésium	0 gr. 17
Alun de fer	0 gr. 0172 (soit : 0.002 de Fe).
Sulfate de zinc	0 gr. 0088 (soit : 0.002 de Zn).
Silicate de potassium	0 gr. 008
et acide succinique	8 grammes.
ou saccharose.	9 grammes.
et acide succinique (pour acidifier).	0 gr. 10

(1) En évaporant à sec, dans une capsule de platine, les eaux-mères débarrassées par cristallisation et décantation de la majorité de l'acide succinique qu'elles renfermaient, j'ai obtenu un résidu dans lequel il y avait 0 milligr. 11 de manganèse pour un kilogramme d'acide succinique « purissime » du commerce.

(2) On peut déjà constater l'action d'un cent-millionième et même d'un milliardième de manganèse en faisant les cultures dans certains matras en verre peu attaquables ou mieux dans des vases en porcelaine. On utilise dans mon laboratoire des cuvettes cylindriques en porcelaine recouvertes d'une sorte de cristallisoir renversé en verre mince que retiennent, pour éviter l'obturation complète, des crochets en aluminium.

Le sulfate de manganèse, préparé à partir du permanganate de potassium, comme je l'ai déjà indiqué (1), était introduit, sauf, bien entendu, dans les matras témoins, sous forme de solutions titrées dont on défalquait le poids des 200 grammes d'eau pure.

Après avoir été bouchés avec des tampons d'ouate hydrophile et recouverts de capuchons en papier, les matras étaient stérilisés à 115 degrés durant vingt minutes.

Les spores ou conidies employées pour les ensemencements provenaient tantôt d'une race banale, développée sur le liquide ordinaire de Raulin (expériences 4 à 9), tantôt d'une race particulière au laboratoire, très sensible au zinc (expériences 1 à 3). Dans ce dernier cas, on mettait 100 fois moins de sulfate de zinc dans le liquide nutritif qu'il est indiqué ci-dessus.

Deux procédés ont été mis en usage pour les ensemencements. Dans le premier (expériences 1 à 5), on transportait directement les conidies à la surface du liquide nutritif à l'aide d'un fil de platine, en multipliant un même nombre de fois les transports, de manière à compenser autant que possible les différences qui existaient entre chacun d'eux. Dans le second procédé (expériences 6 à 9), on préparait d'abord une dilution de conidies dans l'eau stérilisée, puis, en agitant bien chaque fois, on prélevait un cent. cube de cette dilution par matras.

Les cultures ont été faites, non dans une étuve, où la température varie trop d'un endroit à un autre, mais dans une chambre thermostat, à la température uniforme de + 35 degrés. Les récoltes ont eu lieu, suivant les expériences, après neuf à douze jours.

Voici, rassemblés en un tableau, les résultats de *toutes* les expériences que j'ai entreprises avec les doses de 1/100.000.000, de 1/1.000.000.000 et de 1/10.000.000.000 de manganèse. Dans ce tableau, les expériences 1 à 7 ont été réalisées avec l'acide succinique et les expériences 8 et 9 avec le saccharose acidulé par l'acide succinique comme substances alimentaires carbonées.

(1) En collaboration avec Javillier. *Bull. Soc. chim.*, 4e série, t. XI, p. 212, 1912.

Nos des exp.	DURÉE en jours.	POIDS SEC, EN GRAMMES, DES RÉCOLTES OBTENUES : Sans addition de Mn.	APRÈS ADDITION DE Un cent-millième de Mn.	Un milliardième de Mn.	Un déci-milliardième. de Mn.
1	9	1,55	2,05	»	»
	»	1,79	»	»	»
2	9	0,865	1,715	1,260	»
3	10	0,68	1,69	1,30	1,11
	»	0,68	»	»	»
4	10	0,61 (moy. de 3 cult.)	1,49	»	»
5	10	1,16	»	1,24	1,27
6	10	1,14	»	1,73	»
	»	1,23	»	»	»
7	12	0,64 (moy. de 3 cult.)	1,89	»	0,655
8	10	0,55	»	0,80	»
9	9	0,557 (moy. de 3 cult.)	2,35 2,20	1,18 »	0,603 (moy. de 3 cult.)

Je n'ai pas dosé seulement le poids de matière sèche de chaque récolte, j'ai préparé aussi les cendres dans lesquelles j'ai recherché et dosé le manganèse, quand il y avait lieu. Les conditions de la recherche me permettant d'atteindre jusqu'au millième et probablement jusqu'au demi-millième de milligramme du métal cherché, je n'ai trouvé trace de manganèse ni dans les récoltes témoins (expériences 1 à 7) prises séparément ou reprises après en avoir réuni quinze ensemble, ni dans aucune des récoltes obtenues sur les milieux au milliardième et au déci-milliardième. Par contre, j'ai retrouvé de 1 à 1,5 millième de milligramme de manganèse dans les récoltes développées sur les milieux au cent-millionième, qui en renfermaient la quantité absolue de 2 millièmes de milligramme.

Ainsi, malgré toutes les modifications introduites dans la

composition du milieu nutritif, la race du végétal, la durée de la culture, modifications qui ont nécessairement fait varier le poids des récoltes d'une expérience à l'autre, la même conclusion générale ressort avec évidence de chacune de celles-ci, prise en particulier, à savoir qu'*une proportion extraordinairement petite de manganèse suffit au développement de l'Aspergillus niger*.

Les résultats de ces recherches, bien conformes à l'interprétation catalytique du rôle joué par le manganèse dans les cellules vivantes, sont très suggestifs.

On possédait jusqu'ici des exemples remarquables de sensibilité de l'organisme aux poisons. En ce qui concerne particulièrement l'*Aspergillus niger*, Raulin avait montré qu'il suffit d'ajouter la proportion minima d'un 1/1.600.000 de nitrate d'argent au milieu de culture pour nuire sensiblement aux progrès du végétal (1). En opposant à ce résultat l'influence favorable exercée sur le même *Aspergillus* par le 1/10.000.000.000 de manganèse, on voit que l'organisme peut être plus sensible encore aux substances biogénétiques.

Il va donc falloir considérer avec plus d'attention que jamais l'intervention possible des traces de métalloïdes et de métaux présents dans le corps des animaux et des plantes et, par généralisation, des substances complexes dont la proportion n'est guère plus élevée. Il faudra envisager aussi comme pouvant avoir de l'importance dans certains phénomènes physiologiques ou pathogéniques, dans le degré de fertilité des sols, etc., des modifications chimiques du milieu en apparence très minimes.

Enfin, il sera nécessaire, dans beaucoup de recherches, de se mettre très soigneusement en garde contre l'influence des impuretés. J'ai rencontré dans les préparations les plus pures de sulfate ferreux du commerce de 0,2 à 0,5 p. 1.000 de manganèse. D'après les expériences rapportées aujourd'hui, quelques dixièmes et même quelques centièmes de milligramme de ce sel peuvent donc suffire pour apporter dans un milieu de culture une dose de manganèse facilement appréciable par l'*Aspergillus niger* et pour faire attribuer, par erreur, au sulfate

(1) Études chimiques sur la végétation. *Thèse doct. ès sciences*, p. 133, Paris, 1870.

ferreux des effets dus exclusivement à une impureté qui l'accompagne.

On peut supposer que, dans mes propres expériences, l'ensemble des substances nutritives des milieux témoins renfermait encore des traces infinitésimales de manganèse. Est-il possible d'atteindre un degré de pureté plus parfait et qu'arriverait-il alors avec l'*Aspergillus*? C'est ce que je me propose maintenant de rechercher.

* * *

SUR LE ROLE CAPITAL DU MANGANÈSE

DANS LA PRODUCTION DES CONIDIES DE L'ASPERGILLUS NIGER

Au cours de ses belles recherches sur le développement de l'*Aspergillus niger*, Raulin a mis en évidence le rôle favorable exercé par une petite quantité de fer sur l'accroissement global de la plante : la dose de 10 milligrammes de ce métal, à l'état de sulfate, dans un litre de liquide approprié, lui a fourni les meilleures récoltes. Raulin n'a pas étudié le mode d'action du fer; il semble néanmoins lui attribuer un rôle spécial dans la formation des spores ou, plus exactement, des conidies. « En l'absence des sels de fer, fait-il, en effet, remarquer, les spores se forment de plus en plus péniblement à mesure que le liquide d'où elles naissent a déjà produit un plus grand nombre de récoltes » (1).

Cette remarque a récemment attiré l'attention de Sauton et l'a conduit à diverses expériences à la suite desquelles il a cru pouvoir lier définitivement la production des conidies à la présence du fer (2).

Une telle conclusion dépassait la portée des résultats obtenus. Reprenant les expériences, en collaboration avec Sauton, Javillier a reconnu que le phénomène de la formation des conidies était plus complexe et dépendait à la fois, mais d'une manière

(1) *Thèse de doctorat ès sciences physiques*, p. 186, Paris, 1870.

(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLI, p. 241, 1911, et *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, p. 922, 1911.

différente, de la présence du fer et de celle du zinc. Lorsque, en effet, on ajoutait les deux métaux à la dose habituelle de 1/100.000, les conidies apparaissaient normalement et, si on n'ajoutait que du zinc, la plante restait stérile; mais, si on ne mettait ni fer, ni zinc, les conidies se produisaient au moins aussi vite qu'en présence de fer seul. D'où cette nouvelle mais évidente conclusion que le fer n'est pas, comme il paraissait tout d'abord, l'élément indispensable à la sporulation (1).

Ces curieux résultats trouvent leur explication dans certaines expériences que je poursuis actuellement à propos du rôle biologique du manganèse et que je vais résumer.

Je rappellerai, tout d'abord, combien il est difficile d'obtenir les sels minéraux et les produits organiques indispensables à la culture de l'*Aspergillus niger* dans un état de pureté suffisant lorsqu'il s'agit d'expériences précises sur l'intervention biologique du manganèse. J'ai donné une mesure de cette difficulté dans les recherches que j'ai faites avec Javillier sur l'influence combinée du manganèse et du zinc sur la végétation (2); une meilleure encore dans celles que je viens de publier sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse (3).

Dans les premières de ces recherches, nous avons, Javillier et moi, employé des doses relativement grandes de manganèse, élément dont nous voulions connaître alors la proportion optimale, et les milieux nutritifs les purs qui servaient de témoins renfermaient encore, malgré toutes les précautions, à peu près 1/500 de milligramme de manganèse par litre. Dans ces conditions, nous avions observé que « le manganèse possède une action qui, sans être très marquée, est cependant sensible sur la formation des conidies, autant qu'on en pouvait juger par la coloration des cultures. Les *Aspergillus* cultivés sur des doses moyennes de ce métal (1/25.000 à 1/1.000) étaient, à l'arrêt des cultures, sensiblement plus noires que les *Aspergillus* témoins, d'une part, et les *Aspergillus* plus riches en manganèse, d'autre part ».

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLIII, p. 1177, 1911.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et p. 515, 1912.
(3) *Ibid.*, p. 767.

J'ai réussi depuis, comme on l'a vu (1), à purifier d'une façon beaucoup plus parfaite toutes les substances nutritives et à opérer dans des conditions où l'influence du manganèse peut être étudiée avec une très grande précision. J'ai reconnu alors qu'en présence des doses habituelles (1/100.000) de zinc et de fer, mais en l'absence de manganèse, il n'y a pas de formation de conididies par l'*Aspergillus niger* : les colonies restent indépendantes les unes des autres, contractées et de couleur blanche.

Si, en outre du zinc et du fer, on ajoute une trace de manganèse, on obtient, au contraire, un beau mycélium, dont la surface, noire et veloutée, est un véritable tapis de conidiophores.

J'ai varié mes expériences en introduisant dans le liquide nutritif soit du saccharose, soit de l'acide succinique, comme source de carbone; en prenant les conidies soit de la race banale, spontanée, soit d'une race particulière au laboratoire, très sensible au zinc, pour les ensemencements; enfin, en essayant des doses diverses de zinc et de manganèse. Les résultats ainsi obtenus me permettent de formuler les conclusions générales suivantes :

Le fer, le manganèse, le zinc et, sans doute, tous les éléments nutritifs, agissent synergiquement sur la croissance et sur la formation des conidies de l'*Aspergillus niger*.

Lorsqu'un de ces éléments vient à manquer ou, tout au moins, à se raréfier beaucoup, la plante se développe à peine, elle ne produit, en conséquence, presque pas de matière organique.

Quel que soit l'état de développement, si la proportion de manganèse passée dans la matière organique est trop minime, la plante reste stérile; elle se recouvre, au contraire, de conidies, si la quantité de manganèse absorbée par le mycélium atteint une proportion suffisante.

Ainsi, il y a un rapport entre le manganèse, d'une part, le fer et le zinc, d'une autre, qui suffit à la croissance de l'*Aspergillus*, mais qui ne permet pas le développement des organes de reproduction.

(1) Dernière citation.

Ces conclusions générales permettent de comprendre ce qui se passe dans les cas différents de la culture de l'*Aspergillus niger*, y compris ceux des expériences antérieurement publiées. Lorsqu'on n'opère pas avec des substances suffisamment pures, et j'ai rappelé combien cette condition est difficile à remplir, les très minimes quantités de manganèse introduites dans les milieux nutritifs peuvent suffire, en présence du fer et du zinc, pour obtenir des mycéliums abondants, mais sans conidies. Une nouvelle quantité de manganèse ajoutée alors, soit intentionnellement, soit comme impureté du sulfate ferreux, lequel en renferme toujours (1), détermine la sporulation. Lorsque, au contraire, dans le milieu nutritif, on n'ajoute ni fer, ni zinc, ou seulement du fer ou du zinc, les mycéliums qui prennent naissance sont si réduits que le rapport de manganèse introduit, volontairement ou non, au poids de matière organique formée peut être suffisant à la production des conidies.

Ces recherches, établissant des relations entre le fer, le manganèse et le zinc dans l'équilibre des fonctions physiologiques de l'*Aspergillus niger*, sont remarquables à plus d'un point de vue. Non seulement elles nous fournissent un exemple très net de l'existence d'éléments dominateurs de certaines fonctions biologiques, mais elles nous portent à considérer cette notion, importante et rarement envisagée, sous un aspect nouveau. Sans doute l'iode, dans l'action complexe de la glande thyroïde, le fer et le cuivre, dans le rôle convoyeur d'oxygène du sang chez divers animaux, possèdent le caractère d'éléments dominateurs puisqu'ils font partie intégrante soit de la thyroïdine, soit de l'hémoglobine ou de l'hémocyanine, mais la vie devient rapidement impossible chez les animaux privés de leur glande thyroïde ou de leur sang, tandis que l'*Aspergillus niger* peut se développer admirablement sans formation de conidies. Dans le cas des animaux considérés, l'iode, le fer ou le cuivre dominent plus qu'une fonction physiologique, ils dominent la vie tout

(1) J'ai dosé dans les échantillons de sulfate ferreux les plus purs que j'ai pu me procurer en France et en Allemagne de 0,2 à 0,5 milligrammes de manganèse par gramme de sel. Pour ce dosage, j'ai opéré directement sur le sulfate ferreux, suivant la méthode que j'ai décrite antérieurement (*Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 361, 1911), mais en ajoutant un peu plus de persulfate de potassium et, afin d'atténuer la coloration jaune du composé ferrique, un gramme de phosphate acide de potassium.

entière; dans celui de l'*Aspergillus*, le manganèse, indispensable aussi au développement général de l'individu, conditionne, en outre, une fonction de résistance temporaire et de propagation nécessaire seulement à l'espèce.

Les mêmes recherches, jointes d'ailleurs à celles que j'ai déjà citées dans ce mémoire, font ressortir d'une manière frappante la synergie des éléments constitutifs de la matière vivante. A des proportions diverses, grandes ou petites, tous ces éléments sont nécessaires, tous concourent à la formation, au moins globale, des liquides et des tissus dont l'individu se compose. L'insuffisance d'un seul de ces éléments peut entraîner la diminution de tous les autres et provoquer, par suite, un arrêt général de la croissance. Ainsi consolidé par l'expérience directe, le principe de la synergie des éléments dans l'édification de l'organisme prend une grande importance au point de vue du choix de certaines médications, de l'établissement des régimes, du choix et du dosage des engrais.

Enfin, la modification profonde apportée dans le cycle évolutif de l'*Aspergillus niger* par un minime changement dans la quantité de manganèse mise à la disposition de cette plante, apporte un argument bien digne d'être pris en considération dans la recherche des causes de la subordination des processus fonctionnels chez les êtres vivants.

LA LÈPRE DES RATS

(SECOND MÉMOIRE)

RECHERCHES ÉTIOLOGIQUES

ET RÉFLEXIONS QU'ELLES SUGGÈRENT A PROPOS DE LA LÈPRE HUMAINE

par E. MARCHOUX et F. SOREL.

Etiologie.

La maladie du rat est certes une maladie très intéressante en elle-même. Mais si nous en avons entrepris l'étude, ce n'est pas dans le but unique d'en pénétrer les mystères. Nous avons été surtout attirés par la ressemblance de cette affection avec la lèpre humaine et, devant l'impossibilité d'expérimenter sur les animaux avec le bacille humain, par l'espérance d'appliquer à la lèpre de l'homme quelques-unes des conclusions de notre travail sur la lèpre des rats. L'étiologie, les voies de pénétration des germes, en un mot l'épidémiologie d'où découle la prophylaxie, voilà les questions qui nous ont surtout préoccupés.

Dès que nous eûmes constaté l'existence de la maladie de Stefansky parmi les rats vivant dans l'agglomération parisienne, nous avons cherché à nous en procurer un certain nombre pour observer chez les animaux capturés la marche de l'affection. Comme nos devanciers, nous avons vérifié que la lèpre étendue à l'épiderme et aux muscles était rare, alors que nous la rencontrions beaucoup plus fréquemment limitée aux ganglions sous-cutanés et à leur voisinage.

Par inoculation péritonéale, le bacille se multiplie dans les viscères. — On pouvait se demander si la localisation presque exclusive de l'infection à la région superficielle ne tenait pas à des exigences biologiques du parasite qui se développerait difficilement à la température plus élevée des organes profonds, le foie et la rate, si rarement lésés. Pour nous en assurer,

nous avons inoculé dans le péritoine un certain nombre de rats blancs.

Exp. VI. — 27 juillet 1911. Un rat d'égouts sacrifié présente des lésions assez marquées autour du paquet ganglionnaire inguinal. Des lambeaux de tissu conjonctif sont broyés en eau distillée stérile. Le liquide louche qui surnage après dépôt des particules volumineuses, est riche en bacilles A. R. Quelques gouttes en sont injectées dans le péritoine de 5 rats blancs.

20 octobre 1911. — Une mère pleine est morte dans le bocal. Elle porte au niveau de la rate un nodule de la grosseur d'un petit pois qui est contenu dans l'épaisseur de l'épiploon et adhère à la paroi pariétale du péritoine. Ce nodule est rempli d'A. R. Tout l'épiploon en contient. On en trouve aussi sur la paroi de l'utérus gravide, mais point dans le placenta, ni dans les fœtus. Le foie, un peu gras, contient d'assez nombreux bacilles. La rate en renferme aussi beaucoup. Dans les frottis faits avec de la pulpe provenant des sommets du poumon, se voient quelques A. R., mais on en trouve surtout en grande quantité dans les préparations de ganglions médiastinaux.

2 novembre. — Un deuxième rat meurt. Les ganglions mésentériques renferment une énorme quantité de bacilles. La rate en est farcie, de même que l'épiploon. Pas de bacilles dans les frottis du foie. Les poumons ont été mangés par les autres rats du même bocal et n'ont pu être examinés. Des bacilles assez nombreux sont trouvés dans les frottis des ganglions inguinaux et axillaires.

3 novembre. — Un troisième rat est sacrifié. Il est beaucoup moins infecté que le précédent. Dans les ganglions mésentériques, l'épiploon et la rate, il y a quelques bacilles. On n'en voit pas dans les frottis de foie. Les ganglions bronchiques sont pleins d'A. R. Quelques-uns aussi se rencontrent dans le poumon. Il y en a dans un ganglion inguinal.

5 décembre. — Le rat qui est mort aujourd'hui porte appendue à l'épiploon une petite tumeur de la taille d'une noisette qui est bourrrée d'A. R. Beaucoup dans l'épiploon, la rate, les ganglions mésentériques ; moins dans le foie. Un petit nombre se rencontrent dans les poumons et beaucoup plus dans les ganglions bronchiques.

20 décembre. — Le dernier rat meurt. A. R. nombreux dans les ganglions inguinaux, dans les ganglions mésentériques, l'épiploon, la rate, le foie, dans les ganglions médiastinaux. Quelques-uns dans les poumons. Des fragments de foie et de rate sont fixés et coupés. Dans le foie, les bacilles sont contenus dans les cellules de Kupfer et aussi dans les cellules du tissu conjonctif des espaces porte. La disposition des bacilles dans la rate est la même que dans les ganglions, les foyers sont aussi compacts.

L'inoculation intra-péritonéale est tout aussi sûre que l'inoculation sous la peau et le bacille se développe avec autant de facilité dans l'épiploon, le foie et la rate, que dans le tissu conjonctif sous-cutané. Il faut donc admettre que l'infection spontanée ne se fait pas dans la profondeur.

L'inoculation spontanée est superficielle. — L'époque tardive à laquelle apparaissent les lésions des organes abdominaux,

la précocité, au contraire, de l'envahissement des ganglions superficiels, indiquent nettement que la porte d'entrée est ouverte dans le revêtement cutané ou à son voisinage.

Par nos expériences d'inoculation, nous avons vu que les bacilles A. R. se rendent très exactement aux ganglions qui servent de confluents aux lymphatiques de la région inoculée. Une infection du train postérieur, faite à la partie moyenne du dos ou sur la ligne blanche, provoque l'infection des ganglions inguinaux droits et gauches. Si l'inoculation est unilatérale, la lésion ganglionnaire est unilatérale également.

Faite au-dessus de l'ombilic, la blessure infectante contamine les ganglions de l'aisselle, du côté où elle est pratiquée.

De la tête ou du cou, l'infection gagne les ganglions sous-maxillaires et cervicaux. Cette localisation des germes est si précise qu'elle peut servir à explorer le système lymphatique du rat.

Toutes ces observations sont d'accord pour dénoncer l'inoculation cutanée et même signaler la région où elle s'est faite.

Il fallait alors chercher comment elle se produisait.

Elle ne se fait pas par la cicatrice ombilicale ou le mamelon. — Un certain nombre de rats capturés très jeunes et conservés au laboratoire, isolés dans des cages, étaient porteurs de bacilles quand on les sacrifiait à l'état adulte. Cette constatation avait, tout d'abord, attiré notre attention sur une infection possible de la cicatrice ombilicale.

En ce cas, ce serait toujours le groupe ganglionnaire axillaire qui serait atteint et non pas le paquet de l'aine. La localisation inguinale, si fréquente, nous a fait rejeter cette hypothèse.

L'infection par le mamelon doit être écartée pour des raisons du même ordre. Si elle se faisait toujours par cette voie, elle serait aussi commune dans l'aisselle que dans l'aine. D'autre part, il est impossible de trouver des mamelons chez les mâles qui sont, cependant, plus fréquemment infectés que les femelles. Parmi les rats reconnus spontanément malades, nous avons trouvé 64 p. 100 de mâles, et seulement 36 p. 100 de femelles.

La localisation des germes ne renseigne pas sur le point de départ de l'infection. — Pensant que la première multiplication microbienne et aussi la plus importante devait se faire toujours *in situ* au point d'inoculation, nous avions entretenu l'espoir de découvrir la porte d'entrée par l'examen direct.

Sur un certain nombre de rats spontanément infectés, nous avons pratiqué, avec le bistouri, des raclages successifs de la partie profonde du derme, en nous éloignant progressivement du ganglion infecté. Avec la pulpe ainsi obtenue, nous pratiquions des frottis et nous y recherchions les bacilles acido-résistants. Cette méthode, qui nous permettait de trouver des germes dans des régions assez éloignées de notre point de départ, ne nous donnait que des indications trop vagues pour pouvoir en tirer une conclusion.

Nous avons pris le parti de sacrifier le temps nécessaire à faire l'examen d'un rat malade par fixation et coupe de la peau.

A cet effet, nous avons prélevé et fixé une notable étendue de peau dans toute la région que les frottis nous avaient indiquée comme contaminée. Cette pièce recouvrait plus de la moitié de l'abdomen; elle s'étendait à droite jusqu'à l'aine et comprenait la peau du fourreau, des bourses et de la base de la queue. Cette peau a été partagée en segments et coupée en série. Les rubans, disposés parallèlement dans des portefeuilles en carton, formaient des bandes de 25 centimètres environ.

Dix coupes de chaque bande ont été colorées et examinées. Nous supposions qu'une zone d'infection plus intense nous permettrait de découvrir le point d'inoculation primitif. Notre espoir a été déçu, ainsi qu'en témoigne le schéma ci-après. Nous avons trouvé des foyers échelonnés et nombreux indiquant ou bien de multiples portes d'entrée, ou encore des lieux d'élection du bacille qui s'y est multiplié plus qu'ailleurs. En somme, le rat était plus infecté qu'il ne paraissait au premier abord, et la maladie, loin d'être à son début, avait déjà envahi une notable étendue de la peau.

Devant la difficulté de ces recherches histologiques et leur incertitude, nous avons renoncé à les continuer. Nos expériences d'inoculation nous ont, d'ailleurs, averti de l'erreur qui les avait motivées. Comme nous avons pu nous en rendre compte, le point d'inoculation, non seulement n'est pas toujours le lieu

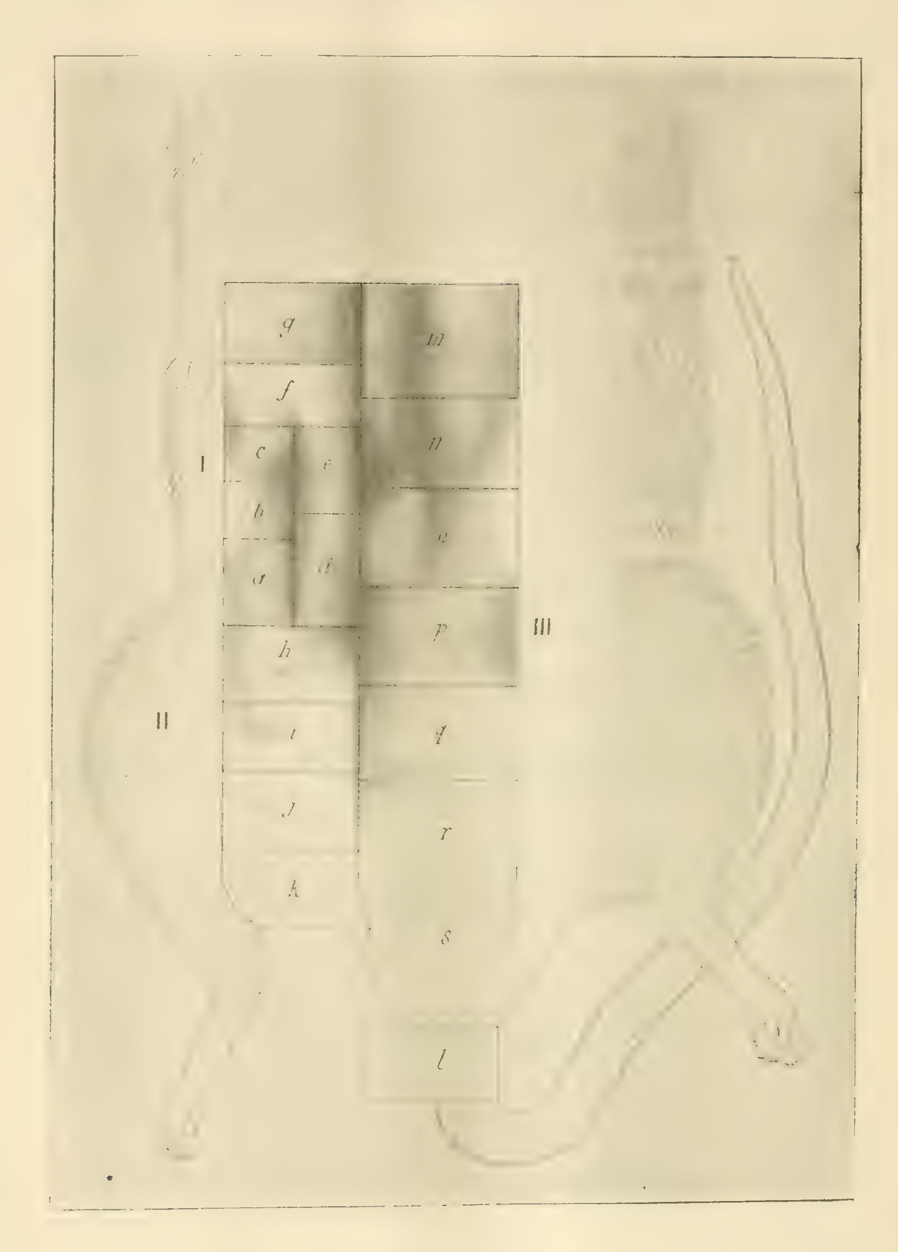


Fig. 2. — La zone marquée de lettres indique l'étendue de la peau qui a été fixée et coupée; les parties ombrées, le siège et le nombre relatif de bacilles.

où les bacilles se sont multipliés le plus abondamment, mais il arrive parfois qu'il est le siège d'une infection insignifiante ou même nulle, alors que les ganglions de la région sont remplis de bacilles. On en verra des exemples dans les expériences que nous avons rapportées plus haut.

Il n'y a pas de contagion génitale. — Une contagion génitale nous avait paru tout d'abord vraisemblable, car nous avons trouvé assez communément infecté le tissu conjonctif sous-cutané de la vulve. Il est vrai qu'au contraire, nous n'avons jamais vu de bacilles acido-résistants, ni dans la peau du fourreau chez le mâle, ni sous la muqueuse du pénis.

Pour élucider cette question, nous avons organisé deux séries d'expériences. Dans l'une, quatre femelles ont été infectées à la vulve et laissées dans une cage d'élevage en contact avec un même nombre de mâles. Les animaux sont restés un an en observation.

Plusieurs générations de petits sont sorties de cette souche. Ni les mâles ni les petits n'ont présenté la moindre trace de bacilles acido-résistants.

Cependant les bacilles traversent la muqueuse saine du fourreau. — Une autre cage d'élevage a servi à loger d'autres familles de rats, deux mâles et quatre femelles. Aux deux mâles, on avait introduit, dans le fourreau, et sans produire aucune lésion, un peu de matériel très riche en bacilles acido-résistants. Au bout d'un an, ces rats ont été sacrifiés : les femelles étaient saines, les deux mâles étaient infectés. Les ganglions inguinaux, assez gros, renfermaient un grand nombre de bacilles. Il y avait aussi des bacilles dans les ganglions axillaires. Chose curieuse, ni sur le pénis, ni sur le fourreau, on n'a trouvé trace d'infection.

Les arthropodes parasites des rats ne véhiculent pas les germes. — L'hypothèse de la transmission de la maladie par des insectes parasités devait être aussi envisagée. Nos recherches dans cette voie se sont trouvées tout naturellement limitées. La lèpre du rat est une maladie très répandue, puisqu'on

l'a observée dans toutes les parties du monde. Là où elle existe, elle frappe un assez grand nombre d'individus. Si ce sont des insectes piqueurs qui véhiculent la maladie, ces insectes doivent évidemment se rencontrer partout et s'y rencontrer en grand nombre.

Trois parasites du rat réunissent ces conditions; ce sont deux insectes, le pou du rat (*Hœmatopinus spinulosus*), une puce (*Ctenocephalus serraticeps*), et un acarien (*Lœlaps echidninus*).

Puces. — Quand elles sont nombreuses dans un élevage, les puces font courir aux animaux de sérieux dangers.

Les souris sont tuées en quelques jours, non point comme on pourrait le croire par un virus que transmettraient les insectes, puisque l'inoculation du sang d'un animal mort à une souris saine ne cause aucun malaise à celle-ci; ce sont les piqûres multiples auxquelles sont en butte les animaux d'expérience qui amènent leur mort, soit par empoisonnement venimeux, soit par anémie grave, comme en témoigne l'augmentation considérable du nombre des poïkylocytes et des globules nucléés, soit par suite des deux actions réunies.

Les rats sont moins sensibles que les souris, mais ils succombent aussi, quoique moins vite, quand les puces sont nombreuses. Aussi doit-on veiller soigneusement à en limiter la pullulation dans les bocaux d'expériences.

Nos recherches pour découvrir des bacilles dans le tube digestif ou les organes des puces qui s'étaient nourries sur des animaux sérieusement infectés, sont toujours restées vaines.

Poux. — En écrasant sur lame des poux prélevés sur des animaux infestés, nous y avons bien découvert des bacilles acido-résistants, mais différant assez sérieusement d'aspect avec les bacilles de la lèpre. Ils sont plus gros, plus courts, avec des extrémités plus arrondies et ne possèdent que des propriétés acido-résistantes atténuées. A côté d'articles franchement rouges après action de l'acide azotique au dixième, on en trouve d'autres qui sont violets ou même totalement bleus.

Pensant qu'il ne fallait pas accorder trop d'importance aux caractères morphologiques, nous avons fait passer des poux d'animaux malades sur des animaux sains. Quand nous avons

opéré avec des rats gris, rats que nous avions cependant pris la précaution de choisir très jeunes, nous avons observé qu'un certain nombre d'entre eux après six ou huit mois étaient porteurs de bacilles acido-résistants typiques dans leurs ganglions. Mais outre que tous les animaux d'une même expérience n'étaient pas malades, toutes les tentatives faites pour provoquer l'infection chez des rats blancs d'élevage sont demeurées infructueuses.

Il faut donc croire à une infection discrète des rats gris, infection qui s'est accusée au laboratoire avec le temps. Un certain nombre d'autres rats choisis de même et conservés dans les mêmes conditions, mais sans être soumis à une phtyriase expérimentale, étaient infectés dans de semblables proportions après six ou huit mois de séjour au laboratoire.

Lœlaps. — Chez les Lœlaps, trois espèces de bacilles A. R. ont été rencontrés : 1° un bacille court et trapu, ayant tous les caractères de celui du pou ; 2° un bacille long, filamenteux, extracellulaire non alcoolo-résistant ; 3° en grand nombre, quand il existe un bacille intracellulaire, alcoolo et acido-résistant qui morphologiquement rappelle celui du rat. Des expériences en cours établiront s'il s'agit d'un germe particulier ou du bacille de Stefansky. Les Lœlaps infectés, 2 p. 1.000 environ, se trouvent aussi bien sur des rats malades que sur des rats sains. Les élevages de rats blancs sont envahis par ces acariens et jamais un cas de lèpre spontanée ne s'y est montré.

Sarcoptes. — Jolly, Mugliston, ont fait jouer aux acariens de la gale un rôle important dans la transmission de la lèpre humaine. La gale est une maladie commune des rats; c'est une affection aussi répandue que la race murine elle-même, il convenait donc de rechercher son influence dans la diffusion de la lèpre. Pour élucider la question, nous avons fait vivre dans la même cage des animaux atteints de la gale et de lèpre cutanée et des animaux sains. Voici une expérience qui a été conçue sur ce thème :

Exp. VII. — 4 novembre 1909. Un rat d'expérience mâle, chez lequel on constate la présence de nombreux acido-résistants au point d'inoculation, situé à la base de la queue, est enfermé dans un bocal avec 4 rats blancs

femelles. Ce rat porte un peu de gale à l'un des points d'élection, c'est-à-dire à la queue et au voisinage du point contaminé, on n'en voit pas encore ni au nez, ni aux oreilles.

29 janvier 1910. — Un des rats blancs meurt. On trouve sur lui des puces et des poux qu'on écrase sur lame et dans lesquels par coloration on ne découvre aucun A. R. Le rat présente également quelques signes de gale à la base de la queue.

On fait des frottis par grattage au bistouri des faces superficielles et profondes de la peau. Aucun A. R. n'est rencontré dans ces frottis, pas plus que dans les ganglions de l'aine et de l'aisselle.

4 février. — Un autre rat blanc meurt avec les mêmes accidents et les mêmes parasites que le précédent. Les ganglions inguinaux sont volumineux, mais on n'y trouve, pas plus d'ailleurs qu'aux différents points de la peau explorés, trace d'A. R.

10 février. — Le rat gris infecté meurt. Il porte de très nombreux A. R. au point d'inoculation et dans le voisinage. A la base de la queue, sous la peau remplie de sarcoptes on trouve des bacilles en très grande quantité. Le tissu conjonctif depuis le lien d'inoculation jusqu'aux ganglions inguinaux des deux côtés renferme des A. R. Les ganglions eux-mêmes ne sont pas volumineux, mais renferment cependant un très grand nombre de microbes spécifiques.

25 février. — Le troisième rat blanc meurt. Il est complètement galeux, mais ne porte pas trace de lèpre. On ne trouve chez lui, malgré de nombreux examens, aucun bacille de Stefansky.

18 mars. — Le dernier rat, couvert de gale, est sacrifié. Pas d'A. R.

Comme on le voit par cette expérience, en passant d'un animal à l'autre les sarcoptes n'emportent pas avec eux de bacilles de Stefansky, même quand ils proviennent d'une région infectée. Cette observation est d'accord avec les prévisions qu'on pouvait faire. Les sarcoptes vivent dans l'épaisseur de l'épiderme; parfois, à la vérité, ils pénètrent dans le derme, mais ils sont logés dans leurs sillons et ne changent pas d'hôtes. Sauf les cas où les animaux parasités les retirent et les projettent sur d'autres par grattage, c'est par les larves que la gale se transmet d'un animal à l'autre. Ces larves passent d'un bocal où se trouvent des rats galeux à un bocal voisin contenant des animaux sains. Elles se font véhiculer par des arthropodes qui grimpent sur le verre. Nous avons vu deux larves de sarcoptides que malheureusement nous n'avons pu faire déterminer, sur les pattes d'un Lœlaps.

L'expérience que nous rapportons ci-dessus a été corroborée par un très grand nombre d'observations faites tant au cours d'expériences pratiquées spécialement avec des animaux galeux, qu'à l'occasion de plusieurs autres dans lesquelles la gale est

intervenue comme un épisode et a atteint non seulement les animaux inoculés, mais des témoins conservés avec eux.

On peut donc dire que le sarcopte de la gale ne véhicule pas ordinairement la lèpre. Mais il n'entre pas dans nos intentions de dénier toute influence à la gale dans la transmission de la maladie de Stefansky. On a vu, par les expériences d'inoculation rapportées plus haut, qu'il suffisait d'un bacille bien placé pour provoquer une infection.

La gale ouvre une porte d'entrée par laquelle la maladie peut s'introduire, si la peau excoriée vient au contact d'une source microbienne comme en portent les rats atteints de lèpre ouverte.

Demodex. — Nous n'avons pas pu vérifier par l'expérience l'hypothèse ingénieuse de Borrel, et rechercher le rôle des Demodex comme agents de dissémination. Certes, les Demodex ne manquent pas chez les rats et, dans nos très nombreuses coupes, nous en avons rencontré beaucoup; mais nous n'avons jamais observé de rapports étroits entre ces acariens et les germes qui s'accumulent en quantité si grande autour des glandes sébacées et des follicules pileux.

Il ne nous paraît pas impossible, si ces Demodex, passant à l'état de larves d'un animal à l'autre, emportent avec eux quelques bacilles comme l'a vu parfois Borrel, qu'ils puissent communiquer la lèpre aux animaux qu'ils parasitent. La facilité avec laquelle nous avons obtenu la contamination de nos rats d'expérience, plaide tout à fait en faveur de cette opinion. Mais pour que les Demodex servent d'agents de transmission, il faut un concours de circonstances qui ne doit pas se produire souvent. La maladie de Stefansky est trop répandue pour n'avoir que cet unique moyen de contage.

Morsures et contacts septiques servent à la propagation. — L'influence d'un contact septique est certainement beaucoup plus grande. Nous avons essayé à plusieurs reprises de la mettre en évidence, mais nos expériences ne nous ont pas donné de résultats assez nets pour que nous soyons autorisés à les rapporter ici. Nous poursuivons d'ailleurs dans cette voie toute une série de recherches sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

Un phénomène que nous avons en tout cas observé couramment, augmente singulièrement les chances de contage. Quand ils sont enfermés dans une même cage, les rats gris se battent fréquemment, non point comme les souris quand on réunit deux élevages, mais chaque fois qu'une cause de trouble ou de frayeur se produit. Les animaux malades sont souvent en butte à l'hostilité de ceux qui sont bien portants. Aussi, quand on introduit un rat lépreux et ulcéré avec des jeunes, confiant dans sa force et pour prévenir une attaque, il se jette en général sur ses congénères et les blesse, ou même parfois les tue. Les plus faibles se disposent en groupes pressés dans un coin de la cage et cherchent à se cacher les uns derrière les autres. Ce mode de groupement est d'ailleurs, on le sait, la règle pour tous les animaux de l'espèce murine.

Ces mœurs à la fois batailleuses et craintives sont propres à assurer d'une part la sortie des germes, et, d'autre part, leur diffusion. Les blessures qu'on observe le plus facilement sur les rats capturés sont à la queue ou chez les mâles à la peau des bourses. Le siège de ces portes d'entrée explique assez bien que la maladie se transmette fréquemment à l'arrière-train, et que les ganglions inguinaux soient si souvent atteints.

Pour nous assurer que des blessures de cette espèce peuvent permettre l'infection, nous avons pratiqué, sur un certain nombre d'animaux, avec la pointe d'un bistouri, des entailles à la peau, comme pourraient le faire les incisives des rats. Sur ces petites plaies nous avons très légèrement, et sans enlever les poils, passé un tampon de coton trempé dans un liquide septique.

Exp. VIII. — Le 27 juillet 1911, on prélève sur un rat d'égout un peu de tissu conjonctif rempli de bacilles A. R., on le broie en eau physiologique et on le conserve à la glacière jusqu'au 16 août. A cette date, avec un bistouri on transperce la peau de 4 rats. La pointe de l'instrument a pénétré un peu dans les muscles de la région fessière droite. Avec un tampon de coton imbibé du liquide infectieux extrait de la glacière, on mouille légèrement les poils des animaux blessés au droit de la porte d'entrée qui vient d'être faite.

25 décembre 1911. — Un rat meurt. Il porte des bacilles A. R. au point d'inoculation et dans les ganglions inguinaux, qui sont d'ailleurs assez petits.

5 janvier 1912. — Un deuxième rat succombe. Bacilles A. R. dans les ganglions inguinaux droits et gauches. Plus abondants à droite.

9 janvier. — Décès d'un troisième rat qui, comme les deux précédents, a des A.R. dans les ganglions inguinaux.

23 février 1912. — La mort du dernier rat se produit ce jour. On trouve dans les ganglions inguinaux de très nombreux A.R.

Cette expérience, comme celles qui ont été rapportées plus haut, montre la facilité avec laquelle peut se faire et doit se faire dans la nature la contamination des rats chez lesquels on trouve des bacilles spécifiques dans les ganglions de l'aine.

De nombreuses observations faites sur des rats trouvés spontanément infectés contribuent fortement à établir le rôle des blessures superficielles de la peau dans la transmission de la maladie. Il arrive très souvent qu'on trouve le tissu conjonctif périmammaire infiltré de pigment noir. Ce pigment est d'origine hématique, comme l'indique la réaction au ferrocyanure de potassium. Or, presque chaque fois qu'existe cet apport pigmentaire, il y a infection lépreuse. Cette coïncidence est même si commune que nous pouvons presque à coup sûr prévoir l'existence de bacilles d'après la couleur de la région mammaire. Or, ce pigment ferrique se dépose dans le tissu conjonctif périganglionnaire et dans les ganglions quand on produit une blessure superficielle de la peau, comme on peut le voir dans l'expérience II rapportée plus haut. Sa présence chez des rats spontanément infectés indique donc très vraisemblablement que les bacilles se sont introduits par une plaie superficielle de la peau ayant existé sur le territoire drainé par les lymphatiques du ganglion malade.

Contamination axillaire. — L'infection des ganglions axillaires se fait aussi par morsures, nous en avons eu des preuves indéniables, par envahissement bacillaire de cicatrices récentes, chez des rats sauvages. Mais elle peut aussi emprunter une autre voie.

Certains auteurs ont pensé à l'infection par les oreilles ou le museau, qui sont fréquemment atteints de gale. Mais la porte d'entrée est ici moins perméable qu'à la queue. La présence des sarcoptes dans ces régions détermine la formation de véritables épithéliomas par prolifération des cellules de Malpighi. Des excroissances cornées quelquefois très proéminentes s'élèvent sur le nez et les oreilles, et couvrent les sillons.

D'autre part, toutes nos recherches pour trouver des bacilles dans les oreilles sont restées vaines.

L'infection n'a pu être produite au travers de la pituitaire. — G. Dean signale la présence de germes spécifiques dans le mucus nasal des rats lépreux, nous n'avons pas eu de peine à vérifier l'exactitude de cette observation.

L'auteur anglais, appliquant au rat l'hypothèse énoncée par Jeanselme et Laurens (1), et plus tard par Sticker (2), pense que la pituitaire est une voie d'excrétion bacillaire et une voie naturelle de contamination. Nous ne partageons pas cette opinion. Une expérience qui, à la vérité, nous a surpris par ses résultats, nous a montré la résistance de la pituitaire à l'infection.

Nous avons frotté vigoureusement jusqu'à amener un petit écoulement sanguin, les narines droite et gauche de 12 jeunes rats avec un bout de coton imbibé de matériel septique qui a servi à en infecter 24 autres. Aucun d'eux n'a été trouvé porteur de bacilles ni dans le nez, ni dans les ganglions cervicaux, ni ailleurs.

C'est donc par une autre voie que se fait l'infection des ganglions axillaires.

Infection pulmonaire d'emblée par les voies digestives. — Dans un lot d'animaux provenant d'un clos d'équarrissage, il nous est arrivé d'en rencontrer un certain nombre chez lesquels on trouvait des bacilles dans l'aisselle en grande quantité et peu ou pas du tout dans l'aine.

Chacun d'eux avait aussi des A. R. dans le poumon et les ganglions médiastinaux, phénomène qui ne doit pas surprendre si on veut se reporter à ce que nous avons dit au chapitre de l'anatomie pathologique.

Cependant un de ces animaux avait des A. R. seulement dans le poumon et les ganglions médiastinaux, point du tout ailleurs. De nombreux et soigneux examens nous permettent de l'affirmer.

(1) Jeanselme et Laurens, Des localisations de la lèpre sur le nez, la gorge et le larynx. *Soc. méd. des Hôp.*, 1897, 23 juillet.

(2) Sticker, Mittheilungen über Lepra nach Erfahrungen in Indien im Ægypten. *Münch. med. Wochensch.*, 28 septembre-5 octobre 1897 et *Lepra Conferenz.* Berlin, 1897, 1re partie, p. 99.

D'où vient cette localisation intrathoracique? L'expérience ci-dessous en donne l'explication.

En faisant absorber à de petits rats des aliments infectés de bacilles A. R., nous avons reconnu qu'on provoque parfois une infection primitive du poumon.

Exp. IX. — Le 1er juillet 1910, un rat d'expérience 55 est sacrifié. Il porte un volumineux nodule à A. R. qu'on broie dans l'eau physiologique stérile. De ce liquide très riche en bacilles on fait boire deux gouttes à huit petits rats blancs âgés de vingt-quatre jours.

12 octobre. — Un des rats est mort. Pas d'A. R. dans les ganglions superficiels, ni dans les ganglions mésentériques qu'on recherche avec soin et dont on examine attentivement plusieurs.

Il est un fait assez remarquable, c'est que les rats d'expérience qui ont maintenant quatre mois sont restés notablement plus petits que des rats de cet âge et même que des jeunes rats nés trois semaines après eux.

16 octobre, 9 heures. — Un des petits rats meurt sans A. R. dans les ganglions mésentériques, le foie ou la rate.

1er décembre. — Un troisième rat est trouvé mort dans le bocal d'expérience. Il est putréfié tellement qu'on ne peut examiner les organes abdominaux. En ouvrant le thorax, on remarque que les ganglions médiastinaux sont volumineux. Ils sont examinés et on y trouve un grand nombre d'A. R. Des frottis sont aussi préparés avec des fragments des poumons prélevés à différents endroits. Dans ceux qui ont été faits avec de la pulpe des sommets, on rencontre un nombre relativement faible d'A. R. dont quelques-uns sont disposés en groupes de trois ou quatre.

2 décembre. — Un quatrième rat est mort aujourd'hui. L'autopsie complète en est faite avec grand soin. Comme dans le précédent, les frottis des ganglions médiastinaux et des sommets pulmonaires renferment des A. R. Dans la pulpe des deux poumons prise à la partie moyenne ou à la base, point de bacilles. Tous les ganglions mésentériques qu'on peut trouver servent à faire des frottis. Dans un d'entre eux, quelques bacilles A. R. peu nombreux sont rencontrés. Rien par ailleurs.

16 décembre. — Décès d'un cinquième rat, dans lequel on ne trouve point d'A. R.

5 mars 1911. — Le sixième rat meurt sans A. R.

21 avril. — Les deux derniers rats sont sacrifiés. Aucun A. R. chez eux. Ces rats de onze mois étaient restés de petite taille.

Voilà donc des rats d'élevage, nés au laboratoire et par conséquent indemnes de toute contamination spontanée, qui ont simplement absorbé des bacilles, en grand nombre il est vrai, et qui ont présenté une affection pulmonaire primitive. Dans la paroi de l'œsophage, dans celles de l'estomac et de l'intestin on n'a trouvé aucun dépôt bacillaire.

Les ganglions mésentériques n'étaient point particulièrement volumineux et dans la plupart des cas n'étaient point infectés.

Mais chez deux d'entre eux l'infection s'est faite beaucoup plus loin.

Comment expliquer cette immunité relative des ganglions de la région qu'a traversée le virus et le transport des bacilles au poumon? Tout s'est passé comme si les ganglions mésentériques ne recevaient que les lymphatiques de la paroi intestinale, ceux des villosités se dirigeant vers le canal thoracique. Quant au mode d'introduction des bacilles, on peut le concevoir par la rentrée dans le circuit lymphatique de quelques-unes des cellules migratrices qui existent si nombreuses dans la lumière intestinale, et qui auraient absorbé un certain nombre de bacilles. Retenues ensuite par le filtre pulmonaire, elles ont servi à l'infection des ganglions médiastinaux.

Il faut aussi compter avec l'existence de quelques zones dénudées d'épithélium le long du trajet de l'intestin. Le fait que l'infection ne se produit pas dans tous les cas plaiderait en faveur de cette hypothèse. Faut-il enfin admettre que ce bacille immobile peut passer au travers des muqueuses saines, comme il passe au travers de la peau épilée? Il nous est impossible pour le moment de prendre parti dans la question. Des expériences en cours nous renseigneront peut-être plus tard.

Quel que soit le mode de pénétration des germes, la paroi intestinale une fois franchie, la majeure partie des cellules parasitées se rend, non dans les ganglions mésentériques, mais dans le canal thoracique, voie par laquelle elles gagnent le poumon.

Il est vrai qu'on peut faire une autre hypothèse pour expliquer cet envahissement pulmonaire précoce et admettre que l'infection passe par les premières voies digestives.

Mais en ce cas on devrait rencontrer des bacilles dans les ganglions cervicaux aussi bien que dans les ganglions médiastinaux. C'est une constatation que nous n'avons pas faite. La localisation des bacilles et l'absence de germes dans la sous-muqueuse œsophagienne nous portent à écarter cette interprétation. Nous sommes au contraire conduits à regarder comme probable la pénétration au travers de l'intestin, puisque nous avons dans un cas trouvé des bacilles dans un ganglion mésentérique.

Cette observation d'infection pulmonaire dans la lèpre du

rat après ingestion de matériel septique concorde avec les faits signalés par Calmette dans la tuberculose. Dans cette maladie comme dans la lèpre, le bacille spécifique, par la voie lymphatique, arrive très vite au poumon, mais le bacille tuberculeux, parce qu'il est toxique et qu'il immobilise rapidement la cellule hôte, reste dans le poumon au lieu d'être évacué sur les ganglions.

Comment se contaminent dans la nature ces rats sauvages? Nous avons pu observer que les murins nourris avec de la viande, même quand ce sont des rats blancs d'élevage, perdent cette humeur douce qui les fait rechercher dans les laboratoires. Ils deviennent batailleurs et mordent fréquemment ceux qui les soignent.

Des rats sauvages vivant dans un clos d'équarrissage, se nourrissent évidemment de la viande des animaux abattus. Les batailles parmi eux doivent devenir plus fréquentes, et bien des animaux parasités qui, nous le savons, sont souvent en butte aux attaques des rats sains, succombent dans ces luttes et sont dévorés par les vainqueurs. Par la voie digestive, comme aussi par les pattes antérieures, qui sont chez le rat des organes de préhension, l'infection peut passer assez facilement aux animaux sains et gagner poumons et ganglions axillaires.

Une autre hypothèse dont nous n'avons pas encore pu établir la valeur, se présente naturellement à l'esprit : le bacille qui contamine le rat peut vivre aussi dans les débris de viande que dévorent les rats. Si ce fait était établi, il expliquerait assez bien pourquoi on trouve en plus grand nombre les rats lépreux dans les abattoirs, les dépôts d'os et les clos d'équarrissage.

L'alimentation carnée n'influe pas sur la marche de la maladie. — Nous avions cru qu'il fallait attribuer à l'alimentation carnée la propriété de favoriser le développement des germes chez les animaux infectés et l'apparition des stigmates de lèpre.

Pour nous en assurer, nous avons organisé une expérience sur quarante-deux rats blancs qui tous ont été infectés par badigeonnage septique de la peau du dos épilée. Ces animaux ont été partagés en deux lots de vingt et un, dont l'un a reçu

comme alimentation du pain mouillé et du grain, l'autre du grain et de la viande crue.

Nous ne rapporterons pas dans le détail cette expérience qui a duré près de huit mois. En voici les résultats.

Comme dans toutes nos expériences, la plupart des rats sont morts spontanément de cette pseudo-tuberculose qui nous enlève tant de sujets d'expérience. Un certain nombre d'entre eux ont succombé avant que l'infection par les bacilles A. R. soit facilement perceptible.

Sur les rats nourris avec de la viande l'infection s'est révélée plus tardivement; le premier animal pris n'a été vu que quatre mois après le début de l'expérience, alors qu'au bout de deux mois l'infection était diagnosticable chez les animaux nourris avec des hydrates de carbone. Du quatrième au huitième mois, les rats à viande étaient porteurs d'un plus grand nombre de bacilles que les autres, mais la proportion des malades a été finalement plus grande chez les rats à hydrates de carbone (66,6 p. 100, contre 50 p. 100 chez les autres). Il ne faut pas attacher à cette dernière conclusion une importance très grande parce qu'elle découle naturellement du fait que ces animaux ont été porteurs de bacilles d'une façon plus précoce. Ceux qui sont morts entre le deuxième et le quatrième mois sont naturellement venus corser la statistique, puisque le premier malade dans la série à viande ne s'est montré qu'à cette dernière époque. En somme, le régime carné n'a pas d'influence sur le développement de la maladie lépreuse des murins.

Chez tous ces rats, comme chez la majeure partie de ceux que nous avons contaminés expérimentalement, les ganglions malades n'étaient pas augmentés de volume et l'infection n'avait point, comme dans la maladie spontanée, gagné les tissus voisins.

On peut se demander tout d'abord si le gonflement ganglionnaire est bien sous la dépendance de l'infection bacillaire, comme tendrait à le faire croire l'examen des animaux spontanément atteints de lèpre. Il est permis d'en douter. L'hypertrophie des ganglions est tellement commune chez les rats d'égouts qu'il ne faut guère s'étonner de la rencontrer souvent sur les rats lépreux. Cette adénite n'est d'ailleurs pas, comme nous l'avons écrit au début de ce mémoire, aussi constamment

observée dans la lèpre que certains auteurs l'ont prétendu. En tout cas, elle n'autorise pas un diagnostic que seul l'examen microscopique permet de porter.

L'inoculation de virus pur donne toujours la forme ganglionnaire. — La localisation presque exclusive et constante de l'infection aux ganglions indique qu'il manque chez les rats d'expérience un facteur favorisant qui se rencontre dans la nature pour produire la lèpre vraie. La détermination de ce facteur a été pour nous pendant longtemps un problème obsédant dont la solution nous a été apportée par une expérience que nous relatons ci-après.

L'inoculation impure produit la forme musculo-cutanée. — L'un de nous, ayant obtenu en milieu impur la culture d'un bacille acido-résistant qui peut être le bacille de Hansen (1), et étant convaincu du rôle des infections secondaires dans la généralisation de la lèpre humaine (2), plusieurs expériences furent entreprises pour rechercher l'action des inoculations impures sur le développement de la lèpre des rats. L'inspiration était bonne, comme le prouve celle qui suit et que nous donnons à titre d'exemple.

Exp. X. — Le 18 décembre 1909, un rat blanc d'expérience 52, est sacrifié. On en retire du matériel septique, ganglions et tissu conjonctif, qui, par broyage dans l'eau physiologique, donne un liquide très riche en A.R. A ce liquide est ajouté un peu d'une culture en gélose d'un coccus retiré du mucus nasal d'un lépreux. Avec ce mélange, six rats blancs sont inoculés sous la peau du dos à la base de la queue.

26 décembre. — Tous les rats portent une plaque d'induration au point où ils ont reçu le virus impur. Tous ont des ganglions inguinaux gros et durs.

3 janvier 1910. — Un des rats est sacrifié. Il porte de gros ganglions, mais aucun des frottis faits avec la pulpe qui en est retirée ne renferme d'A.R. Au point d'inoculation, on en retrouve un certain nombre.

18 juin 1910. — Un rat meurt ce jour. Au point d'inoculation, il porte une plaque de tissu conjonctif chagrinée, très fortement adhérente en son milieu aux tissus sous-jacents. Les ganglions inguinaux sont volumineux.

Dans le nodule d'inoculation, il y a une très grande quantité d'A.R., de

(1) Marchoux, Culture d'un bacille acido-résistant provenant du mucus nasal des lépreux. *Bull. Soc. de Path. exot.*, t. IV, 1911, p. 89.

(2) Marchoux, *Les migrations du bacille de la lèpre.* IIe conférence de la lèpre, Bergen, 1910, IIIe vol., p. 57.

même que dans les ganglions. On en trouve aussi par raclage de la partie profonde de la peau entre le point d'inoculation et les ganglions.

Le paquet ganglionnaire de l'aisselle renferme aussi une notable quantité d'A. R.

6 juillet. — Un troisième rat succombe. Au point d'inoculation, il porte une plaque de la dimension d'une pièce de 1 franc formée de tissu conjonctif épaissi et chagriné.

Les A. R. fourmillent dans les frottis faits avec les produits de raclage de ce nodule.

Tout autour les tissus paraissent normaux, mais ils renferment une notable quantité de bacilles.

C'est surtout à la face ventrale que se trouvent les lésions les plus étendues et les plus caractéristiques. Deux larges bandes de tissu conjonctif épaissi et chagriné entourent les ganglions inguinaux et forment comme un plastron qui double la peau à la région ventrale d'un flanc à l'autre. Ce plastron se prolonge en avant par de longues ailes de forme vaguement triangulaire, qui s'étendent de chaque côté de la ligne blanche jusqu'au thorax. Du côté droit, le plastron basal est plus large et l'aile antérieure plus longue, elle atteint l'aisselle.

Les ganglions de l'aine et de l'aisselle sont tous tuméfiés.

Dans ces tissus lésés et dans les ganglions se trouve une masse énorme de bacilles spécifiques, en nombre aussi considérable que dans la maladie naturelle.

Il y a des A.R. dans les poumons, les ganglions médiastinaux. On en trouve aussi dans la rate, le foie et dans un ganglion mésentérique.

27 juillet. — Décès d'un quatrième rat, pour lequel on ne peut trouver la cause de la mort, ni par examen direct ni par ensemencement du sang ou des organes. Cet animal porte aussi au point d'inoculation une large plaque de tissu conjonctif épaissi et bourré d'A.R. Il existe en avant des groupes ganglionnaires inguinaux des lésions macroscopiques, mais moins importantes que chez le rat précédent. Il y a également chez cet animal une infection discrète du foie et de la rate.

9 août. — Les deux rats qui restent sont aveugles. Les trypanosomiases amenant assez fréquemment de la cécité, on cherche chez eux des trypanosomes sans en trouver. Les deux animaux sont sacrifiés. Ils sont porteurs de lésions spécifiques semblables à celles des deux rats précédents.

Chez le premier, le plastron ventral, un peu plus étendu que sur le rat mort le 27 juillet, l'est cependant moins que sur celui qui a succombé le 18 juin. La lésion est surtout importante à droite. Tous les ganglions superficiels de l'aine et de l'aisselle sont hypertrophiés et remplis de bacilles. Lésions discrètes du foie et de la rate.

Le deuxième rat est porteur de lésions semblables, mais un peu moins étendues.

En faisant un frottis de la cornée opacifiée, on y trouve une grande quantité d'A.R.

Cette expérience a été vérifiée par plusieurs autres dont les résultats ont été les mêmes, quoique moins remarquables. C'est parce qu'elle a été particulièrement démonstrative que nous l'avons rapportée ici. Pour les autres expériences, ce n'est pas

le même microbe d'impureté qui a servi. Chaque fois, il s'agissait d'un staphylocoque pyogène, mais différent. Ces expériences de vérification ont été accompagnées de témoins. En même temps qu'était faite l'inoculation impure à une série d'animaux, une autre recevait le liquide de broyage sans addition de germes étrangers. Sans doute, même dans ce cas, il ne peut être question de pureté absolue, car au cours de la préparation du liquide, malgré l'emploi de verres, de baguettes et d'eau physiologique stériles, il s'introduit des germes étrangers, mais ceux-ci, ou bien ne sont pas pathogènes et par conséquent sont immédiatement détruits, ou bien sont en trop petit nombre pour exercer une action importante.

Sur les témoins, il n'a été observé aucun symptôme de généralisation. Comme toujours, l'infection était limitée aux ganglions, restés de faible volume, et parfois au point d'inoculation.

On peut donc admettre que dans la nature, les mêmes phénomènes se représentent et qu'il faut, pour causer cette lèpre musculo-cutanée, le concours d'une impureté.

Le fait est que chez les rats malades on rencontre presque toujours des lésions pyogènes, des abcès produits par des microbes étrangers, des staphylocoques souvent. Une fois même, dans des coupes de la peau œdématiée, nous avons trouvé une infiltration de staphylocoques qui avait fusé dans le tissu conjonctif et provoqué un œdème avec diapédèse intense de polynucléaires.

En revanche, chaque fois que nous avons trouvé des rats à infection limitée aux ganglions, la peau était très nette et rien autre que le microscope ne permettait de porter un diagnostic.

Parallèle entre la lèpre humaine et la lèpre du rat.

Si nous voulons établir entre la lèpre humaine et la lèpre du rat un rapprochement que légitime la similitude des deux affections, nous pourrons, d'après ce qui précède, formuler sur la maladie de l'homme quelques hypothèses qui en éclaireront singulièrement l'épidémiologie.

Infection hansénienne et lèpre ne sont peut-être pas synonymes. — Tout ce qu'on connaît sur la lèpre concourt à

désigner le revêtement cutané comme le siège de la première inoculation. Nous venons de voir qu'il en est de même pour le rat.

La moindre érosion de la peau suffit au bacille de Stefansky pour pénétrer dans l'organisme. Le bacille de Hansen se comporte peut-être bien de la même façon. La difficulté apparente de contagion de la lèpre ne serait qu'une illusion. Comme chez le rat, infection ne signifierait pas toujours maladie. Il pourrait y avoir, dans les pays à lèpre, beaucoup plus de personnes atteintes qu'on ne le suppose, mais chez la plupart le bacille spécifique cantonné dans un coin de l'organisme y sommeillerait longtemps et souvent pendant toute la vie de l'hôte insoupçonné qui l'héberge.

Les autopsies de gens vivant au voisinage de malades, peuvent seules renseigner sur la réalité des faits dont nous émettons la supposition. Il conviendrait de rechercher les germes dans les ganglions superficiels et dans les ganglions médiastinaux, ces derniers étant sans doute, chez l'homme comme chez le rat, un réservoir où se déversent les bacilles venant de tous les points de l'organisme.

Ces lépreux latents deviendront des lépreux avérés quand une impureté favorisante aura pénétré dans leur organisme ou quand une cause de déchéance physique aura diminué leur résistance. Ce serait à de longues somnolences des germes qu'il faudrait attribuer ces incubations prolongées si fréquemment citées. Ce serait à la lèpre latente qu'il faudrait faire remonter ces cas erratiques qui surgissent tout à coup dans une région sans qu'il soit possible d'en établir la filiation.

Chez l'homme, sans doute, comme chez le rat, la lèpre marche vite quand elle succède à une inoculation impure qui a provoqué une suppuration; elle évolue tardivement quand les germes sont restés inclus dans les organes lymphatiques et qu'une cause accidentelle vient les réveiller de leur long sommeil.

Le contact septique est probablement la cause de l'infection. — Le transport et l'inoculation des germes par les insectes piqueurs ne méritent sans doute pas plus d'attention pour la maladie humaine que pour la maladie murine. Quant à la gale,

elle peut exercer une certaine influence, par les lésions de la peau qu'elle cause. Rien ne s'oppose à ce que le Demodex soit un agent de transport.

La pénétration des germes par les voies digestives est beaucoup plus difficile à admettre, elle se fait seulement quand des masses considérables de germes traversent l'intestin. Si cette éventualité a des raisons de se produire chez les rats qui se mangent entre eux, il n'en est pas de même pour l'homme, qui n'ingère de germes qu'à l'état d'unités et par conséquent sans courir de grands risques.

Chez l'homme, comme chez le rat, le mode de contagion habituel est sûrement le contact, mais un contact intime qui n'a plus que de rares chances de se produire avec la civilisation européenne actuelle. C'est parce que le voisinage des malades dans les hôpitaux est bien loin de l'antique promiscuité, que nous ne voyons plus les cas de lèpre essaimer comme au moyen âge. Nos malades hospitalisés ne couchent plus à huit dans le même lit et portent des vêtements qui leur sont propres.

En dehors des rapports sexuels, les contacts corporels ont bien peu de chances de se produire entre les membres de la population parisienne. Il n'en est point de même dans les pays où la lèpre se multiplie encore. Nous avons constaté une singulière promiscuité à Saint-Dalmas-de-Valdeblore, où l'un de nous, en collaboration avec Bourret (1), fit une enquête dans un petit foyer de lèpre encore en activité. C'était dans une maison d'une malpropreté insigne, où les lits n'étaient sans doute jamais faits, et les draps, autant que nous en pûmes juger par la couleur, jamais changés. Les habitants de cette maison au nombre de quatre, auraient pu avoir chacun leur chambre, le nombre des pièces le permettait, cependant ils couchaient deux à deux. La mère lépreuse partageait son lit avec son fils, un grand gaillard de dix-sept ans et de 1m80 de hauteur, et n'y voyait point de mal. Deux sœurs, dont une lépreuse, dormaient ensemble.

Ces conditions se rencontrent encore très souvent dans nos colonies, non seulement parmi les indigènes, mais aussi parmi les

(1) Marchoux et Bourret, Enquête étiologique dans un foyer de lèpre. *Bull. de la Soc. de Path. exot.*, t. I, 1908, p. 288.

Européens, qui perdent très vite dans le milieu où ils vivent les principes d'éducation et d'hygiène élémentaire qu'on a eu tant de peine à leur enseigner en France.

Elles se trouvent aussi réunies pour les membres d'une même famille. Dans beaucoup de pays les conjoints n'ont qu'un seul lit et couchent souvent leurs enfants avec eux, au moins quand ils sont jeunes. Les mères lépreuses pour soigner et allaiter leurs nourrissons les exposent à de grandes chances d'infection. On est même surpris que dans les familles où la mère est malade tous les enfants ne soient pas atteints. Si, comme dans la statistique de Sand (1), on ne relève parmi eux que 10 p. 100 de lépreux, cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas des lépreux latents en bien plus grand nombre.

Il faut peut-être aussi, parmi les causes de contagion, faire une place assez large au contact indirect par échange de vêtements et lavage de linges souillés.

Dans les idées traditionnelles qui ont survécu à plusieurs générations, il y a presque toujours une part de vérité. Sous sa gaine glutineuse, le bacille de la lèpre résiste peut-être mieux que celui du rat à la dessiccation. En tout cas, il peut se trouver dans des humeurs encore assez fraîches sur des vêtements qui viennent d'être quittés ou sur du linge qui a récemment essuyé des plaies septiques. Les blanchisseuses, par profession, ont souvent l'épiderme des mains éraillé ou fendu, tout préparé pour recevoir les germes.

L'infection produite chez des rats mâles par simple insertion de bacilles spécifiques dans le fourreau, sans lésion de la muqueuse, semble indiquer que les rapports sexuels impurs soient à redouter comme cause de contagion.

Direct ou indirect, le contact joue sûrement le rôle principal dans l'épidémiologie de la lèpre. Cette importance de l'étroite promiscuité découle de l'efficacité des mesures prises en Norvège, où il a suffi de faire vivre les lépreux à l'écart des personnes saines et sans les éloigner de la maison familiale pour arrêter la lèpre.

(1) A. Sand, *Geschicht die Ansteckung der Lepra durch unmittelbare Uebertragung?* IIe conférence de la lèpre. Bergen, 1910, IIIe vol., p. 39.

Conclusions.

1° Il n'est pas tué par une exposition de cinq minutes à la température de 60 degrés. Il meurt à la même température en un quart d'heure;

2° Si l'infection est plus considérable dans les régions superficielles, c'est qu'elle entre par la peau;

3° Elle suit les trajets lymphatiques;

4° Le point d'inoculation n'est pas toujours la région de la peau la plus infectée;

5° Des mâles s'infectent quand on dépose des bacilles dans le fourreau sans faire aucune lésion de la muqueuse;

6° Cependant la maladie spontanée ne paraît pas se transmettre par la voie génitale;

7° Les insectes ne véhiculent pas la maladie;

8° Les sarcoptes de la gale ne peuvent jouer qu'un rôle indirect dans la diffusion de la lèpre;

9° Le contact d'une peau lésée avec une peau malade ou avec des objets fraîchement souillés est le mode de contagion ordinaire;

10° Une grande quantité de germes introduits par la voie digestive donne une infection primitive du poumon;

11° Les ganglions des rats inoculés artificiellement sont généralement petits, contrairement à ceux des rats spontanément malades;

12° C'est la forme ganglionnaire qu'on provoque toujours par inoculation. Pour donner la forme musculo-cutanée, il faut injecter des produits impurs.

ÉTUDES SUR LE BACILLE DE SCHMORL

(SECOND MÉMOIRE)

EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE

par E. CÉSARI

Le cobaye passe pour quasi réfractaire au bacille de Schmorl : il n'en est rien. Le D[r] Girard (*recherches inédites*) a étudié jadis, ici, les îlots nécrotiques que l'on rencontre à l'autopsie de certains sujets et a pu y déceler, par l'examen microscopique et les cultures, la présence du bacille de la nécrose. Mêmes résultats à Mexico, chez un cobaye auquel il avait injecté, dans le péritoine, le sang d'un individu atteint de typhus exanthématique. Voilà pour la *maladie naturelle* ; quant à la *maladie expérimentale*, elle a été de notre part l'objet de recherches suivies et nous espérons en montrer tout l'intérêt dans les lignes qui vont suivre.

Nous étudierons successivement les injections *sous-cutanées*, *intraveineuses* et *intrapéritonéales*.

INJECTIONS SOUS-CUTANÉES

Suivant les conditions expérimentales, on observe divers types cliniques qu'il est *indispensable* de bien connaître. C'est seulement, en effet, après avoir vu se dérouler sous ses yeux les *images variées* qui traduisent les *réactions variées* de l'organisme au bacille de la nécrose (et à sa toxine) que l'on peut tenter de pénétrer plus avant dans la pathogénie des affections dues à ce microbe.

Rien de plus facile que de réaliser les types dont nous parlons. Prenons une culture en bouillon Martin glucosé (2 p. 1.000), culture ayant séjourné vingt-quatre heures à 37 degrés (1).

(1) Toute notre étude expérimentale a été faite sur l'échantillon dit *Primus*. Nous nous sommes assuré, préalablement, que les autres races, isolées avec V. Alleaux, déterminaient des effets à peu près identiques.

Injectons 1 cent. cube du liquide, bien agité, sous la peau d'un cobaye (animal de 500-600 grammes) : nous obtenons un type que nous appellerons type C (réaction à la somme : microbes + toxine). Centrifugeons à fond, avec l'appareil de Jouan, la même culture et injectons 1 cent. cube du liquide clair : nous observons le type dit conventionnellement A (réaction à la toxine. — Les quelques corps microbiens restés dans le liquide sont négligeables; on obtient d'ailleurs des effets identiques avec les filtrats, mais il faut forcer la dose). Lavons (une fois) le dépôt de centrifugage à l'eau physiologique et rétablissons le volume initial de la culture avec de l'eau physiologique, puis injectons 1 cent. cube du liquide bien agité : nous réalisons le type E (réaction aux microbes). On obtient tous les types intermédiaires entre A et C (schématisables par un stade moyen, B) en centrifugeant de moins en moins complètement la culture, c'est-à-dire en injectant, avec le liquide clair, des quantités de plus en plus grandes de microbes. Inversement, on réalise tous les types intermédiaires entre E et C (schématisables par un stade moyen, D) en lavant de moins en moins complètement le dépôt de centrifugage, c'est-à-dire en injectant, en plus des corps microbiens, des doses croissantes de toxine.

Nous décrirons d'abord, avec les détails nécessaires, les *types principaux* : A (toxine), E (microbes) et C (toxine + microbes), en mentionnant les *formes dérivées* quantitativement (injection de volumes de liquide supérieurs ou inférieurs à 1 cent. cube, injection de cultures plus ou moins vieilles) et qualitativement (injection de liquides chauffés ou soumis à un centrifugage exagéré). Il suffira, ensuite, de dire deux mots des types B et D, faciles à imaginer.

A la description des types cliniques fera naturellement suite l'étude des conditions qui permettent de les réaliser.

DESCRIPTION DES TYPES CLINIQUES

Type A (*Toxine*).

Forme classique. — Elle se caractérise par la production d'une *eschare humide*, à apparition rapide, dont on peut schématiser ainsi l'évolution.

Quelques heures après l'injection (1) (1 cent. cube de liquide clair), on observe un œdème mou, allant du volume d'une noix à celui d'un œuf de pigeon. Sur cet œdème, la peau montre une tache vert pâle, humide, cerclée de rouge sombre, dont la surface répond à celle d'une pièce de 1 ou 2 francs. — *Le lendemain*, l'empâtement hypodermique s'est aplati, la tache cutanée commence à brunir et à sécher par endroits. — *Le surlendemain*, l'eschare est devenue complètement sèche et d'un noir de jais; l'infiltrat sous-cutané forme un disque de consistance rénitente. — *Le 4e jour*, l'eschare commence à se soulever et on aperçoit un ulcus sec, atone, couleur maigre de jambon. — *Le 5e jour*, le disque sur lequel reposait la lésion nécrotique s'est très aminci. — *Du 6e au 7e jour*, l'eschare tombe; l'ulcus sous-jacent n'est bordé que par un cercle induré étroit. — *Puis*, la perte de substance diminue peu à peu d'étendue et de profondeur et la cicatrisation est accomplie quinze jours environ après l'injection. — En dehors des complications (assez rares), les animaux ne succombent jamais; ils n'offrent qu'une émaciation légère ou même nulle.

Formes dérivées quantitativement. — Si l'on augmente la quantité de liquide injectée, les lésions augmentent également d'étendue et les complications se montrent plus fréquentes. Si on la diminue, l'empâtement et l'eschare diminuent, jusqu'à ce que, finalement, tout se réduise à un infiltrat modéré, recouvert de croûtelles (auxquelles font suite des érosions superficielles), puis à un simple œdème transitoire.

Formes dérivées qualitativement. — Les liquides chauffés, injectés à dose suffisante, déterminent l'apparition d'un empâtement et d'une eschare aussi marqués que dans le type classique, *mais l'aspect initial diffère*. Le premier jour, simple œdème; le lendemain, *tache violette* plus ou moins foncée selon les cas (souvent très pâle) et *à peine humide*. Puis, *eschare brun foncé*, ulcus, etc., comme dans la forme normale.

Complications. — M. M. Nicolle a fait connaître depuis longtemps les complications que l'on rencontre, chez les cobayes, à

(1) Avant la fin de la première heure, l'eschare s'annonce déjà, *loco læso*, par une teinte bleu-verdâtre des téguments.

la suite de l'injection (et, notamment, de l'injection sous-cutanée) de divers microbes et toxines. Ces complications, générales ou locales, sont dues, habituellement, soit à la *pasteurella*, soit au pneumocoque. Nous croyons inutile de les décrire à nouveau. Disons, simplement, qu'au cours de nos expériences sur les cobayes ce sont surtout les infections secondaires à *pasteurella* que nous avons observées.

Type E (*Microbes*).

Forme classique. — Elle se traduit par le développement d'un *bourbillon sous-cutané*, qui évolue schématiquement comme il suit.

Quelques heures après l'injection (1 cent. cube de culture lavée), apparaît un œdème mou, généralement peu étendu et sans mortification de la peau susjacente. — *Le lendemain*, cet œdème dessine une tuméfaction arrondie ou allongée, rénitente, dont le volume oscille entre celui d'une amande et celui d'une noix. — *Le surlendemain*, l'empâtement durcit. — *Le 4e jour*, on perçoit souvent une fluctuation obscure. — *Le 5e jour*, la fluctuation, toujours nette, répond à tout ou partie de l'infiltrat hypodermique. — *Du 6e au 7e jour*, la ponction donne issue à du pus, entourant un bourbillon plus ou moins adhérent encore aux tissus profonds. Ce bourbillon, qui représente l'exsudat sous-cutané nécrosé en bloc, ne diffère en rien de celui d'un furoncle. Il contient, ainsi que le pus, des bacilles nombreux et caractéristiques. — *Du 8e au 9e jour*, si l'on n'a pas ponctionné la peau, on la voit offrir, sur un point limité (tête d'épingle, lentille, au plus), une tache escharotique brunâtre, qui rappelle l'aspect d'une fine brûlure au thermocautère. En ce point, les téguments, très amincis, laissent sortir, par la simple pression, le pus et le bourbillon hypodermiques. — *Du 10e au 11e jour*, le bourbillon s'évacue de plus en plus complètement, surtout si on l'aide à se détacher des parties saines. — *Puis*, la cavité se comble peu à peu, à mesure que l'empâtement limitant rétrocède; la suppuration diminue régulièrement et tout est fini quinze à vingt jours après l'injection. — Les complications sont un peu moins rares que dans le type A. Quand elles font défaut, le pronostic est aussi bénin.

Formes dérivées quantitativement. — Si l'on augmente la quantité de liquide injectée, les lésions augmentent d'étendue et l'eschare apparaît (passage au type D). Une forme pareillement « exagérée », *mais sans eschare*, s'observe aussi, de temps en temps, à la suite de l'injection d'*un seul* cent. cube (sensibilité plus grande de certains sujets au regard des germes). Dans les deux cas, les phénomènes caractéristiques ne se dessinent d'habitude qu'après quelques jours. La lésion s'accroît alors assez rapidement et il se forme un véritable abcès froid (parfois très vaste) à parois épaisses, dont la marche est lente et qui devient volontiers le point de départ de complications locales et générales.

Si on diminue la quantité de liquide injectée, les lésions diminuent également (pois, lentille), comme il fallait s'y attendre.

Formes dérivées qualitativement. — Si l'on injecte des cultures soumises à un lavage exagéré, on n'observe, pendant plusieurs jours, aucun phénomène réactionnel local. Puis apparaît un nodule qui durcit, fluctue au centre et évolue généralement assez vite. Ses dimensions dépassent rarement celles d'une amande.

Complications. — Plus fréquentes qu'avec le type A, surtout dans les formes « exagérées ».

Type C (*Microbes + toxine*).

Forme classique. — *Elle représente*, cela va de soi, la somme des types A et E, c'est-à-dire l'*eschare humide unie au bourbillon sous-cutané*. Le bourbillon est mis ici directement à nu, sans suppuration éliminatrice. L'évolution peut être schématisée comme il suit.

Quelques heures après l'injection (1) (1 cent. cube de culture totale), on observe un œdème mou, crépitant (sauf dans le cas des germes qui fermentent peu le glucose), allant du volume d'un œuf de pigeon à celui d'un petit œuf de poule. Sur cet œdème, la peau montre une tache humide, absolument identique à celle qui caractérise le type A. — *Le lendemain*,

(1) Comme dans le type A, on peut déjà percevoir au point injecté, avant la fin de la première heure, un changement de couleur de la peau caractéristique de sa mortification commençante.

l'œdème, stationnaire ou plus étendu, demeure encore habituellement crépitant; l'eschare humide offre l'aspect d'une « peau morte », entourée d'un cercle brun violacé. — *Le surlendemain*, l'infiltrat hypodermique s'allonge et devient plus ferme ; l'eschare brunit, sèche et se plisse. — *Le 4e jour*, l'eschare fonce et se rétracte. — *Le 5e jour*, elle a pris un ton noir de jais et commence à se soulever ; on aperçoit, alors, le bourbillon (exsudat nécrosé en bloc, comme dans le type E) qui tapisse l'ulcus sous-jacent. L'empâtement, ferme, a beaucoup rétrocédé. — *Du 6e au 7e jour*, l'infiltration forme un disque qui offre, souvent encore, des prolongements en haut et en bas. L'eschare tombe, entraînant une partie du bourbillon ; le reste tapisse un ulcus saignant et se prolonge, sous ses bords, dans le disque qui l'entoure. — *Du 8e au 9e jour*, la perte de substance commence à diminuer ; elle présente un aspect croûteux. Par pression, on fait sortir du disque et de ses prolongements, s'il en existe encore, des restes d'exsudat nécrosé. — *Du 10e au 11e jour*, l'empâtement se réduit à un anneau mince, dépassant à peine les bords de l'ulcus. — *Puis*, celui-ci se cicatrise régulièrement et tout est terminé quinze à vingt jours après l'injection.

Notons que le bourbillon contient des bacilles spécifiques jusqu'à sa complète disparition. — Les complications s'observent plus fréquemment ici que dans les types A et E. A l'autopsie des animaux qui succombent alors, on peut rencontrer des nécroses viscérales (reins, poumons, et *surtout* foie). En l'absence de complications, le pronostic demeure bénin, bien que l'émaciation soit parfois assez accentuée.

Formes dérivées quantitativement. — Comparables, *mutatis mutandis*, aux formes correspondantes du type A.

Formes dérivées qualitativement. — *Elles font défaut*, en réalité. Par le chauffage des cultures, on rend effectivement le type C irréalisable et l'on va de plus en plus vers le type A, à mesure que l'action de la chaleur s'accentue davantage.

Complications. — Fréquentes et précoces, dès que l'on dépasse 1 cent. cube de culture.

Types B et D.

Il est facile de concevoir ce qui a lieu quand on va du type A vers le type C. *L'eschare demeurant la même*, on voit le bourbillon apparaître et augmenter de plus en plus. On imagine sans peine ce que sera le type B, situé à mi-chemin.

Il est non moins facile de concevoir ce qui a lieu quand on va du type C vers le type E. *Le bourbillon demeurant le même*, on voit l'eschare diminuer de plus en plus. On imagine sans peine ce que sera le type D, situé à mi-chemin.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES RÉALISANT LES DIVERS TYPES CLINIQUES

Injection de liquides clairs (*ou, à doses plus grandes, de filtrats*).

Cultures de 24 heures. Nous avons dit qu'avec 1 cent. cube on réalise le type A classique et qu'avec des doses supérieures ou inférieures on obtient des formes dérivées quantitativement. — *Cultures plus âgées.* A mesure que les cultures vieillissent, on voit l'eschare diminuer d'étendue. Après 30-40 jours, il faut doubler la dose pour provoquer des lésions équivalentes à celles que donnent les liquides clairs de 24 heures. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type A à tache violette, à peine humide. — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'un empâtement transitoire.

Conclusions. — Dans le bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000, le bacille de Schmorl sécrète une toxine qui jouit de propriétés escharifiantes marquées, mais demeure pour ainsi dire sans action sur l'état général des sujets. L'injection de 4 cent. cubes de liquide clair (ou même de culture totale) n'amène jamais la mort des cobayes, mais ceux-ci sont assez souvent enlevés par des complications que favorise l'intensité des lésions locales. La toxicité maxima s'observe après 24 heures. Le poison résiste assez bien au vieillissement (en tube fermé) dans l'étuve, mais fléchit déjà nettement à 55 degrés (ses propriétés se modifient alors quantitativement et qualitativement).

Injection de cultures lavées.

Cultures de 24 heures. On sait qu'un cent. cube réalise le type E classique (quelquefois le type « exagéré » sans eschare) ; qu'avec des doses supérieures, l'eschare fait son apparition ; qu'avec des doses inférieures, les lésions diminuent de volume ; enfin, qu'avec des cultures soumises à un lavage trop poussé, on obtient le type tardif. — *Cultures plus âgées.* Les microbes mourant en quelques jours à l'étuve, dans le bouillon Martin glucosé, la réaction locale se borne très vite à un simple empâtement transitoire. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type B à tache pâle (à peine humide). — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'un empâtement transitoire.

Conclusions. — Le bacille de Schmorl est peu virulent pour le cobaye, mais il l'est sans conteste, comme le démontrent l'existence du type tardif (consécutif à l'injection de cultures très lavées) et celle des formes extensives. Le bourbillon résulte de la nécrose de l'exsudat sous-cutané, par la toxine que fournissent les germes *in vivo* (1). La proportion de poison, sécrétée dans l'unité de temps, ne permet pas l'attaque des téguments ; pour obtenir celle-ci, il faut introduire, avec les germes, une quantité suffisante de toxine *disponible* comme dans le cas suivant.

Injection de cultures totales.

Cultures de 24 heures. Nous rappellerons qu'un cent. cube réalise le type C classique et que des doses supérieures ou inférieures engendrent des formes dérivées quantitativement. — *Cultures plus âgées.* Comme les germes périssent rapidement à 37 degrés, on tombe vite dans des types de moins en moins discernables du type A ; bientôt, il n'existe plus aucune

(1) Exclusivement dans le type tardif, en majeure partie dans le type E classique (il faut tenir compte, dans ce dernier cas, du poison non enlevé par le lavage, lequel suffit à déterminer le type D, quand on dépasse 1 cent. cube).

différence entre les effets de l'injection du liquide clair qui surmonte le dépôt microbien et de la culture préalablement agitée. — *Cultures chauffées une demi-heure à 55 degrés.* 4 cent. cubes réalisent le type B à tache violette (à peine humide). — *Cultures chauffées 5 minutes à 100 degrés.* 4 cent. cubes ne déterminent qu'un empâtement modéré, avec quelques croûtelles.

Conclusions. — Nous avons dit que le type C représente la somme des types A et E ; en réalité, il représente à la fois plus et moins. *Plus* : l'eschare ne sèche pas aussi vite ; l'émaciation est toujours nette ; on peut observer des nécroses hépatiques, inconnues dans les types A (naturellement) et E. — *Moins* : les formes extensives du type E ne s'observent jamais, ce qui tient (au moins en partie) à l'étendue de l'eschare, laquelle fait de la lésion sous-cutanée une lésion ouverte. Nous reviendrons plus tard sur ces questions (1).

INJECTIONS INTRAVEINEUSES

Pour éviter des redites inutiles, nous étudierons successivement ici : l'action des *cultures totales* (toujours en bouillon Martin glucosé à 2 p. 1.000 — 24 heures d'étuve), puis celle des *liquides clairs* et des *cultures lavées* qui leur correspondent.

Cultures totales.

Telles quelles.

Avec 1 cent. cube d'une culture bien toxique, seule considérée dans ce qui va suivre, on tue d'habitude l'animal « sur la table », c'est-à-dire que la symptomatologie se trouve réduite à sa plus simple expression. Immédiatement raideur générale ;

(1) On a vu que la crépitation de l'œdème initial, observée dans le type C (sauf avec les germes qui fermentent peu le glucose), fait défaut dans les types A et E. La raison de cette différence est aisée à donner. Quand on injecte la culture totale, on introduit, sous la peau, un peu de glucose demeurant dans cette culture et des microbes susceptibles de continuer à le disloquer jusqu'à sa disparition complète. Quand on injecte des cultures lavées, on a éliminé, naturellement, toute trace de sucre. Quand on injecte du liquide clair, on n'introduit pas trace de zymase (laquelle est considérée comme exclusivement intracellulaire).

puis raptus, perte du réflexe cornéen, deux ou trois inspirations profondes et automatiques; finalement arrêt de la respiration et des battements cardiaques. — *A l'autopsie* : cœur immobilisé en systole, fins caillots entre les piliers ventriculaires, sang coagulable dans les délais normaux.

Avec un demi-cent. cube (et quelquefois 1 cent. cube), les sujets peuvent succomber en 5 à 15 minutes environ. On observe tout d'abord de l'hébétude et de la titubation, puis de brefs accès convulsifs. Bientôt l'animal tombe sur le côté; sa respiration devient très pénible (soif d'air) et ne tarde pas à s'arrêter, en même temps que les mouvements du cœur. Dans les cas rapides, une spume sanglante sort par les narines. — *A l'autopsie* : congestion des viscères abdominaux; œdème pulmonaire, avec foyers apoplectiques punctiformes; cœur immobilisé en systole, mais sans caillots dans les cavités ventriculaires; sang un peu moins coagulable que normalement.

Avec un demi-cent. cube, lorsque la mort ne survient pas en 5 à 15 minutes, elle est ordinairement retardée d'une à quatre heures. Les animaux présentent, au début, de la polypnée et de la stupeur. Ils restent immobiles, « aplatis », le museau contre le sol, dans une attitude de plus en plus nettement parétique. Puis, apparaît une vive sensibilité thoraco-abdominale. Lorsqu'on presse le sujet entre les doigts, il crie et saute violemment en avant, *d'une seule pièce*; si on insiste, il tombe sur le côté, s'agite, puis demeure inerte, dans un état de mort apparente (arrêt respiratoire, perte du réflexe cornéen, battements cardiaques imperceptibles). Bientôt le réveil a lieu, mais l'animal s'achemine peu à peu vers un coma mortel. Finalement, la respiration devient de plus en plus rare et superficielle, jusqu'à ce qu'elle s'arrête. Au cours des accidents, il n'est pas rare d'observer l'émission d'une urine sanglante ou laquée. — *A l'autopsie* : congestion, souvent violente (voire hémorragique), des viscères abdominaux; épanchement rosé habituel dans le péritoine; parfois, urine sanglante ou laquée dans la vessie. Cœur battant encore après l'arrêt de la respiration; sang incoagulable pendant un long temps.

Avec un quart de cent. cube, la mort a lieu en 6 à 12 heures environ. Même *symptomatologie* que précédemment, mais ici les phénomènes se déroulent avec moins de rapidité. Mêmes

lésions également, mais, en plus : taches congestives ou jaunâtres sur le foie (début de foyers nécrotiques).

Avec 1 à 2 dixièmes de cent. cube, l'animal succombe en un jour ou bien guérit. Les accidents observés sont peu caractéristiques : abattement, poil piqué, sensibilité thoraco-abdominale modérée. Si le sujet survit, il « s'en tire » avec une émaciation transitoire. Si, au contraire, la mort doit survenir, on voit se développer un état comateux progressif; la respiration s'embarrasse de plus en plus et il est difficile de saisir le moment précis où elle cesse : *l'animal s'éteint*. — *A l'autopsie* : Congestion plus ou moins marquée des viscères abdominaux, avec épanchement rosé ou citrin dans l'abdomen. Taches nécrotiques, en général peu nombreuses, sur le foie (surface et bords). Ces taches offrent une étendue très variable (grain de mil, petite amande); petites, elles demeurent arrondies; plus grandes, elles montrent, par confluence, un centre homogène et un contour irrégulier (*en jeu de patience*). Leur couleur varie selon leur âge; d'abord amaranthe, elles deviennent ensuite saumonées, puis jaunes, puis cuir de botte. Parallèlement, leur consistance se montre de plus en plus ferme et leur aspect (à la coupe) de plus en plus sec. Elles contiennent toujours des bacilles de Schmorl. Les foyers de nécrose sont rares dans les poumons, la rate et les reins.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 *degrés*. 2 cent. cubes répondent à un quart de cent. cube environ de culture non chauffée; 1 cent. cube, à 1 ou 2 dixièmes. — 5 *minutes à* 100 *degrés*. Aucun effet, avec 2 cent. cubes.

LIQUIDES CLAIRS.

D'une façon générale, on observe les mêmes accidents (rapides) qu'avec les cultures totales. Pour de fortes doses (un demi à 1 cent. cube), les différences d'activité se trouvent masquées par les différences de sensibilité des animaux; pour des doses plus faibles, elles apparaissent nettement : ainsi un quart de cent. cube ne tue jamais. — Le *chauffage* amène le même fléchissement que dans les cultures totales.

Cultures lavées.

Avec 1 cent. cube, aucun effet ; si on sacrifie les cobayes, on n'observe pas de lésions internes. Avec 2 cent. cubes, il en va généralement de même ; cependant, certains sujets, plus sensibles que la moyenne, succombent en 5 à 6 jours, après avoir maigri considérablement. Dans ces cas, on trouve, *à l'autopsie*, des *foyers nécrotiques* et des *abcès* au niveau du foie. Avec plus de 2 cent. cubes, la mort survient d'habitude en 6 à 12 heures ; elle doit être rapportée à la présence de toxine « disponible » en quantité suffisante. — Le *chauffage* rend les cultures lavées inoffensives (à la dose de 2 cent. cubes et plus).

Conclusions.

Le bacille de Schmorl apparaît, ici encore, peu virulent pour le cobaye. Il est cependant susceptible d'un *développement local limité* dans le foie (rarement ailleurs), même quand on fait usage de cultures lavées (si les sujets possèdent une sensibilité suffisante).

La toxine, qui détermine la production d'une eschare humide sous la peau, engendre, dans les veines, une gamme de phénomènes dont l'acuité correspond à la dose administrée. Des quantités notables « assomment » les animaux, avec des coagulations intracardiaques — des volumes moins grands rendent au contraire le sang incoagulable (comme pour les venins) et provoquent une congestion viscérale intense, qui affecte principalement la circulation thoracique dans les cas les plus rapides et la circulation abdominale dans les cas plus lents — des doses suffisamment faibles ne tuent plus ou amènent la mort dans les 24 heures, sans modifier la « crase » du sang, en portant uniquement leur action sur les organes de l'abdomen.

On peut retrouver, au niveau du foie, *les deux lésions viscérales caractéristiques du bacille de Schmorl*, foyers nécrotiques et foyers suppurés, observées chez les diverses espèces animales.

INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES

Leurs effets sont aisés à résumer. Nous suivrons *le même ordre que pour les injections intraveineuses.*

Cultures totales.

Telles quelles.

Avec 1-2 cent. cubes, on tue en 6-12 heures environ. Les symptômes sont à peu près les mêmes que si l'on avait administré un quart de cent. cube par la voie sanguine; toutefois, comme il fallait s'y attendre, on note une intensité particulière de la réaction abdominale (ventre gros et toujours très sensible). — *A l'autopsie* : épanchement rosé ou hémorragique dans les cas rapides, rosé ou citrin dans les cas plus lents; fausses membranes fines, notamment sur le foie, quand la mort ne survient point trop vite; congestion plus ou moins marquée des viscères de l'abdomen. L'épanchement, généralement abondant, contient peu de bacilles spécifiques; dès que la terminaison dépasse un petit nombre d'heures, il s'y joint d'autres germes, avant tout les deux « germes de sortie » habituels des cobayes, pneumocoque et *pasteurella*. (Nous avons omis de mentionner leur apparition, observée de temps en temps, lors des injections intraveineuses).

Avec un demi-cent. cube, les sujets offrent une émaciation variable et rien de plus. Si on les sacrifie après quelques jours, on rencontre des taches nécrotiques sur le foie et, dans certains cas, de petits abcès encapsulés, à pus concret, au niveau de l'épiploon.

Avec 1 dixième de cent. cube, on ne détermine aucun symptôme anormal et l'autopsie (animaux sacrifiés) ne révèle aucune lésion.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 degrés. Avec 4 cent. cubes, on voit apparaître des phénomènes abdominaux transitoires (ventre gros et sensible), accompagnés d'un amaigrissement plus ou

moins marqué et toujours suivis de guérison. — *Cinq minutes à* 100 *degrés.* 4 cent. cubes ne produisent qu'une émaciation modérée.

Liquides clairs.

4 cent. cubes correspondent, *grosso modo*, à 4 cent. cubes de culture totale chauffée à 55 degrés; 2 cent. cubes, à 4 cent. cubes de culture totale chauffée à 100 degrés. — 4 cent. cubes de liquide clair, chauffé une demi-heure à 55 degrés, ne provoquent qu'un amaigrissement transitoire ; 4 cent. cubes de liquide clair, chauffé 5 minutes à 100 degrés, demeurent inoffensifs.

Cultures lavées.

Telles quelles.

Avec 3-4 cent. cubes, on n'arrive pas à tuer les sujets, mais ils maigrissent beaucoup. — *A l'autopsie* (animaux sacrifiés après quelques jours), on rencontre les mêmes lésions que chez les cobayes qui ont reçu un demi-cent. cube de culture totale.

Avec 1-2 cent. cubes, on provoque une émaciation variable. Si on sacrifie les sujets, on constate la présence de lésions hépatiques discrètes.

Chauffées.

Une demi-heure à 55 *degrés.* 4 cent. cubes demeurent quasi inoffensifs.

Conclusions.

Le bacille de Schmorl se montre, ici encore, peu virulent pour le cobaye, tandis que sa toxine détermine les accidents les plus graves. Les phénomènes observés se rapprochent beaucoup de ceux que produisent les injections intraveineuses, à la condition, toutefois, de forcer sensiblement les doses administrées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le cobaye constitue un réactif excellent dans l'étude analytique du bacille de Schmorl in vivo. Les injections sous-cutanées permettent de faire la part exacte de la toxicité et de la virulence de ce microbe, grâce à un examen attentif des apparences qui se succèdent sous les yeux dans chaque groupe de cas; les injections intraveineuses restent indispensables pour compléter l'histoire de la toxicité; les injections intrapéritonéales, enfin, fournissent un utile contrôle aux notions déjà acquises.

Vis-à-vis du cobaye, le bacille de Schmorl manifeste une faible virulence. Les formes extensives (injections sous-cutanées) demeurent peu fréquentes ; les localisations à distance (injections intraveineuses et intrapéritonéales), presque toujours limitées au foie, y conservent, somme toute, un caractère discret indéniable.

Par contre, le cobaye réagit bien à la toxine du bacille nécrosant. Au niveau des téguments, c'est une eschare humide à apparition rapide, lorsque la quantité de poison *disponible* le permet (filtrats, cultures totales) ; ou un bourbillon caractéristique, quand ce poison n'est sécrété qu'en minime proportion dans l'unité de temps (germes lavés). La peau fixe énergiquement la toxine, puisque les injections sous-cutanées n'altèrent pour ainsi dire pas l'état général. Mais que l'on vienne à introduire le poison dans le courant circulatoire, on en observera immédiatement les effets sur l'économie tout entière. — L'injection intrapéritonéale représente en quelque sorte, ici comme ailleurs, le « mode mineur » de l'injection intraveineuse.

LES VARIATIONS DE L'ALEXINE

APRÈS LE CHOC ANAPHYLACTIQUE

DANS LA SÉRO-ANAPHYLAXIE ACTIVE ET PASSIVE

par P.-F. ARMAND-DELILLE.

(Travail du laboratoire de Chimie thérapeutique de l'Institut Pasteur.)

L'étude de la nature du poison anaphylactique a été en ces dernières années l'objet de nombreux travaux; il faut citer entre autres ceux de Friedberger, qui est parvenu à obtenir *in vitro*, par le mélange d'un sérum antigène avec celui de l'animal préparé, un poison qu'il nomme anaphylotoxine, parce qu'il le considère comme identique à la substance toxique qui, dans l'organisme préparé, détermine les accidents anaphylactiques, au moment de l'injection déchaînante.

Cet auteur, ayant reconnu que l'alexine est nécessaire à la constitution de son anaphylotoxine, a cherché à établir l'identité du poison obtenu *in vitro* avec le poison hypothétique qui se développerait dans l'organisme pour déterminer le choc anaphylactique. Reprenant sous une autre forme les premières recherches de Sleeswijk, il s'est basé sur une série d'expériences pour montrer qu'il se produit toujours, après le choc anaphylactique, une diminution plus ou moins considérable de l'alexine du sang circulant.

En contrôlant pour notre part ces expériences, nous avons été amenés à un certain nombre de constatations qui s'écartent de celles qu'a exposées Friedberger (1), et, en particulier, nous avons constaté une différence considérable entre l'anaphylaxie active et l'anaphylaxie passive au point de vue des variations de l'alexine. Comme ces faits ont une grande importance pour la doctrine de l'anaphylaxie, et comme ils paraissent en particulier devoir faire modifier les hypothèses de Friedberger sur la

(1) Friedberger u. Hartoch, Uber das Verhalten des Komplements bei der aktiren und passiren Anaphylaxie. *Zeitschr.*, *f. Immunität*, t. III, 1910, p. 581.

constitution du poison anaphylactique, nous avons pensé qu'il serait intéressant de rapporter ici, avec plus de détails, les expériences dont les conclusions ont été récemment exposées dans une note à la Société de Biologie (1).

Sleeswijk, dans un travail fait dans le laboratoire de Bordet (2), a signalé le premier, que chez les cobayes anaphylactiques auxquels on fait l'injection déchaînante dans le péritoine, on peut observer une diminution de l'alexine dans le sang prélevé un certain temps après le choc anaphylactique. Friedberger, un an après, a fait des constatations analogues, mais avec l'injection déchaînante intraveineuse, la 2[e] prise de sang étant faite cinq minutes après le choc anaphylactique; aussi s'est-il considéré comme ayant découvert le fait, ce qui a nécessité une réclamation de priorité de la part de Sleeswijk, lequel a d'ailleurs par la même occasion contrôlé les expériences de Friedberger en se mettant exactement dans les mêmes conditions que cet expérimentateur (3), tandis qu'au contraire Tsuru a constaté qu'il n'y avait pas de diminution constante de l'alexine dans les différentes formes d'anaphylaxie sauf dans l'anaphylaxie passive par sérum hétérogène.

Nous avons cherché, pour notre part, à réaliser dans les mêmes conditions et avons pu ainsi reproduire les expériences de ces auteurs. Comme Tsuru, nous sommes loin d'avoir trouvé avec une aussi grande constance que Friedberger une chûte nette de l'alexine dans l'anaphylaxie active, tandis que nous l'avons comme lui toujours trouvée considérable dans l'anaphylaxie passive. C'est le point qui nous a paru particulièrement intéressant et sur lequel nous insisterons en terminant.

Toutes nos expériences ont été faites de la manière suivante :

Les cobayes sensibles étaient, pour l'anaphylaxie active, des animaux préparés avec 0,01 cent. cube de sérum de cheval,

(1) P.-F. Armand-Delille, L'alexine joue-t-elle un rôle dans la constitution du poison anaphylactique? *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1[er] juin 1912, t. LXXII, p. 869.

(2) Sleeswijk, Zur Komplementfrage in der Serumanaphylaxie. *Zeitsch. für Immunitatsforsch*, t. V, 1910, p. 580.

(3) Ces auteurs, même dans leurs travaux ultérieurs, netiennent pas compte, en effet, des recherches de Tsuru (Ueber Komplement abnahme bei der verschiedenen Formen der Anaphylaxie. *Zeit. f. Imm.*, 1910, t. IV, p. 612), qui n'avait trouvé aucune diminution de l'alexine après le choc anaphylactique.

au moins quinze jours auparavant, ou bien des animaux éprouvés avec du sérum antidiphtérique dans les mêmes conditions. La dose déchaînante employée a été soit une dose minime, mais sûrement mortelle (0,02 cent. cube par 100 grammes d'animal), déterminée par des expériences préalables, soit des doses plus fortes lorsque nous employons du sérum chauffé. Nous avons, en effet, sur le conseil de M. Nicolle, expérimenté également avec du sérum chauffé pour être certains que le sérum de cheval frais n'apportait pas une quantité d'alexine suffisante pour pouvoir intervenir dans l'expérience.

Les prises de sang, toujours de 2 cent. cubes, étaient faites dans une des carotides, deux minutes avant l'injection déchaînante, puis exactement cinq minutes après. Le sang était immédiatement centrifugé et le sérum aussitôt décanté, de sorte que l'étude du pouvoir alexique était faite une à deux heures après les prises de sang. Nous avons toujours employé un système hémolytique composé de globules de mouton (dilués au 20e) et d'un sérum de lapin antimouton très actif; son activité était chaque fois titrée et les globules étaient sensibilisés avec six fois la dose active. Les quantités de sérum étaient graduées de 0,005 à 0,1. Les résultats de l'hémolyse étaient notés minute par minute pendant une demi-heure, à 38 degrés, puis, le lendemain, au bout de vingt-quatre heures, à la température du laboratoire. Pour l'anaphylaxie passive, nous avons employé du sérum de lapins préparés par cinq à six injections. Nettement précipitante, la dose injectée au cobaye dans le péritoine était de 1 cent. cube par 100 grammes d'animal. La réaction hémolytique était toujours faite en même temps qu'une ou plusieurs séries d'anaphylaxie active.

Voici deux types d'expériences, l'une pour l'anaphylaxie active, l'autre pour l'anaphylaxie passive. Nous ne donnerons qu'un tableau résumé de nos autres expériences, afin de ne pas surcharger inutilement cet exposé.

30 *mai*. — Cobaye A, en anaphylaxie active. Poids : 290 grammes. Reçoit dans la veine jugulaire, par 100 grammes, 0,02 de sérum de cheval, soit : 1,5 cent. cube de dilution à 1/25.

4 h. 8, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 11, injection déchaînante; 4 h. 13,

dyspnée; grandes secousses répétées; 4 h. 15, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 16, mort.

Expérience faite à 5 h. 40, avec sérum obtenu par centrifugation des caillots et globules de mouton sensibilisés avec six fois la dose active.

DOSE D'ALEXINE avant l'injection.	HÉMOLYSE	DOSE D'ALEXINE 5 m. après l'injection.	HÉMOLYSE
0,005	Nulle, même ap. 24 heures.	0,005	Nulle, même ap. 24 heures.
0,01	Nulle, même ap. 24 heures.	0,01	Nulle, même ap. 24 heures.
0,02	Légère en 30 minutes, partielle après 24 heures.	0,02	Très légère en 30 min., partielle après 24 heures.
0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.	0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.
0,05	Totale en 15 minutes.	0,05	Totale en 15 min. (très léger retard).
0,10	Totale en 10 minutes.	0,10	Totale en 10 minutes.

Il y a eu un léger retard pour les doses hémolysantes, mais excédant à peine deux ou trois minutes; l'hémolyse est à peu de chose près parallèle avec l'alexine avant et après la dose déchaînante.

30 *mai.* — Cobaye B. Anaphylaxie passive. Poids : 440 grammes. Reçoit dans la veine jugulaire, par 100 grammes, 0,02 de sérum de cheval, soit 2,5 cent. cubes de dilution au 1/25.

4 h. 32, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 36, injection déchaînante; 4 h. 39, petites secousses; dyspnée intense, état asphyxique; 4 h. 41, saignée, 2 cent. cubes; 4 h. 42, la dyspnée et l'asphyxie diminuent; l'animal se remet; 4 h. 48, l'animal est tout à fait remis.

Expérience faite à 5 h. 40 avec sérum obtenu par centrifugation des caillots et globules de mouton sensibilisés avec six fois la dose active.

DOSE D'ALEXINE avant l'injection	HÉMOLYSE	DOSE D'ALEXINE après l'injection.	HÉMOLYSE
0,005	Nulle, même ap. 24 heures.	0,005	Nulle, même ap. 24 heures.
0,01	Nulle, même ap. 24 heures.	0,01	Nulle, même ap. 24 heures.
0,02	Légère en 30 min., partielle après 24 heures.	0,02	Nulle.
0,03	Partielle en 30 min., presque totale en 24 heures.	0,03	Nulle, même ap. 24 heures.
0,05	Totale en 15 minutes.	0,05	Nulle, même ap. 24 heures.
0,10	Totale en 5 minutes.	0,10	Nulle, même ap. 24 heures.

Par conséquent, même à la forte dose de 0,1 de sérum frais, il n'y a plus aucun pouvoir alexique dans le sang pris après l'injection.

Comme on le voit, nos résultats sont loin de concorder avec ceux de Friedberger pour l'anaphylaxie active; alors que cet auteur trouve toujours une chute de l'alexine dans le sang recueilli après le choc anaphylactique, et 5 minutes après l'injection déchaînante, nous n'avons observé ce phénomène que d'une manière inconstante et légère; nous sommes donc d'accord avec Tsuru sur ce point; au contraire, pour l'anaphylaxie passive, nous trouvons, comme Friedberger, une très forte diminution de l'alexine à la condition d'employer pour la provoquer un sérum hétérogène, résultats absolument différents de ceux de Tsuru, lorsque cet auteur a provoqué l'anaphylaxie passive en employant du sérum de cobaye hypersensibilisé, mais concordants lorsque, comme Friedberger et comme nous, il a employé du sérum de lapin hypersensibilisé.

Nous donnons ci-dessous le tableau comparatif de nos résultats :

1° Anaphylaxie active.

Nos de l'expérience.	DATE	POIDS des cobayes.	DOSE déchaînante intraveineuse.	RÉSULTAT	ACTION DE L'ALEXINE prélevée 5 minutes après l'injection déchaînante.
1	1911 28 déc.	295 gr.	Sér. frais 0,09	Mort en 5 min.	Léger retard de l'hémolyse.
2	28 déc.	440 gr.	Sér. frais 0,12	Mort en 6 min.	Très léger retard.
3	1912 3 févr.	415 gr.	Sér. frais 0,12	Mort en 7 min.	Pas de retard.
4	3 févr.	315 gr.	Intrapérit. 3 c.c.	Se remet.	Pas de retard.
5	15 févr.	320 gr.	Sér. frais 0,09	Se remet.	Très léger retard.
6	15 févr.	310 gr.	Sér. frais 0,10	Mort en 11 min.	Pas de retard.
7	22 févr.	235 gr.	Sér. chauffé 1 c.c.	Mort en 10 min.	Retard net.
8	22 févr.	250 gr.	Sér. frais 0,06	Mort en 10 min.	Très léger retard.
9	25 mars.	230 gr.	Sér. chauffé 1 c.c.	Se remet.	Pas de retard.
10	30 mai.	230 gr.	Sér. chauffé 0,06	Mort en 5 min.	Très léger retard.
Témoin.	25 mai.	An. neuf 410 gr.	Sér. frais 1 c.c.	Aucun symptôme.	Pas de retard.

2° Anaphylaxie passive.

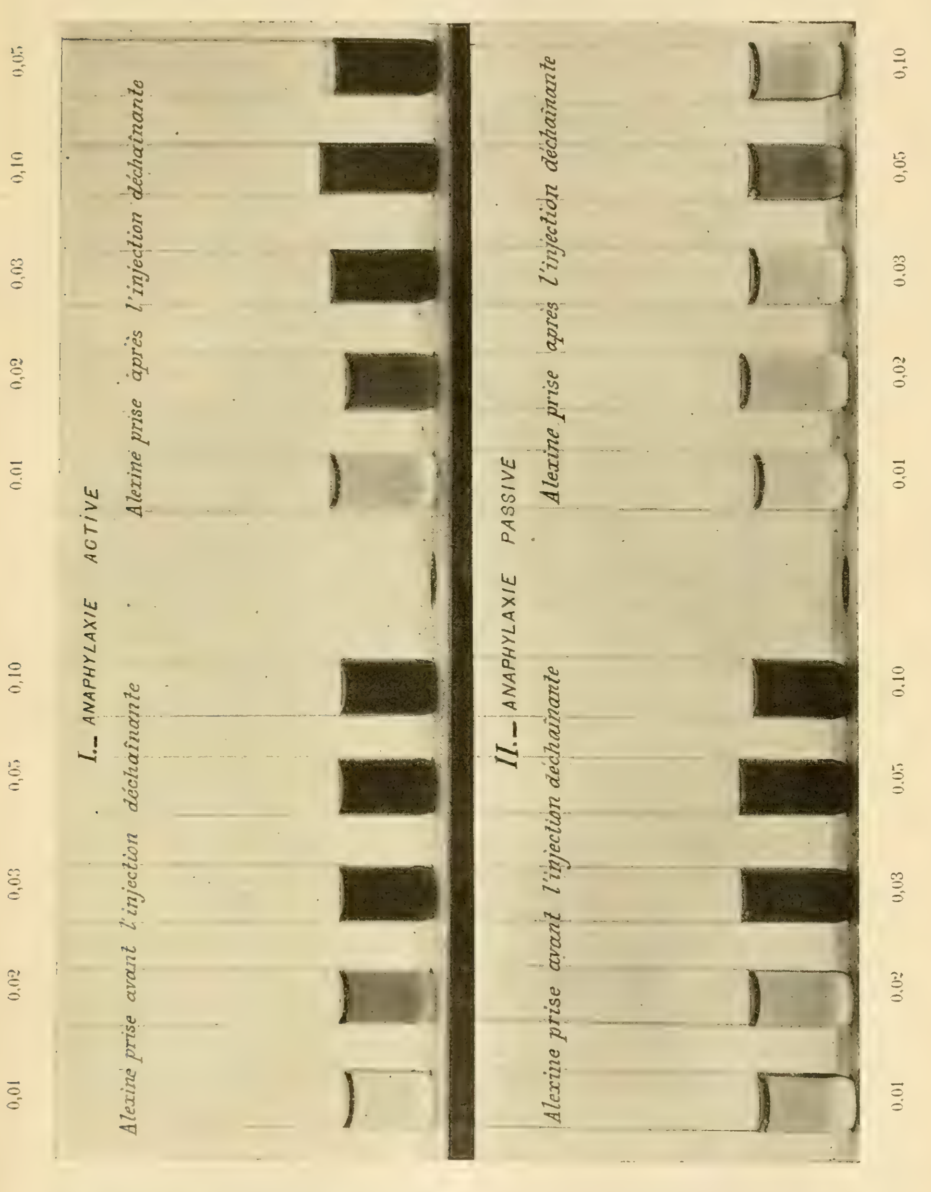
Nos de l'expérience	DATE	POIDS des cobayes.	DOSE déchaînante intraveineuse.	RÉSULTAT	ACTION DE L'ALEXINE prélevée 5 minutes après l'injection déchaînante
1	1912. 16 mars.	300 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Se remet.	Hémolyse nulle à 0,02 même en 24 heures alors que totale à 0,01 en 15 min. dans le témoin.
2	16 mars.	330 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Mort en 20 minutes.	Hémolyse nulle en 24 h. à 0,01 alors que totale en 15 minutes dans le témoin.
3	30 mai.	440 gr.	Sérum frais 0 c.c. 10.	Se remet.	Hémolyse nulle après 24 h. à 0,03 alors que totale dans le témoin.
Témoin cobaye injecté sér. lapin frais.	20 juin.	320 gr.	Sérum chauffé 1 c.c.	Aucun symptôme.	Aucun retard.

A la suite de ces expériences, il nous est permis, nous semble-t-il, de formuler quelques remarques et de tirer quelques conclusions intéressantes.

Tout d'abord, il est loin d'être démontré que l'alexine soit nécessaire à la constitution du poison anaphylactique *in vivo*; en effet, dans l'anaphylaxie active, où les phénomènes sont les plus graves et presque toujours mortels, la diminution de l'alexine est loin d'être constante; il y a des cas où elle est imperceptible, pour ne pas dire nulle, ce qui est en opposition avec la diminution considérable de cette même substance dans l'anaphylaxie passive, quand même les accidents sont légers et non mortels.

Dans ces conditions, comment peut-on expliquer la diminution si considérable de l'alexine dans l'anaphylaxie passive par sérum hétérogène? On peut faire à ce sujet plusieurs hypothèses; la plus légitime, à notre avis, est d'admettre que l'alexine se fixe sur les précipitines ou sur des anticorps qui

coexistent avec les précipitines, car, nous l'avons vu, le sérum de lapin qui est injecté pour produire l'anaphylaxie passive est



toujours fortement précipitant, tandis que le sérum des cobayes en anaphylaxie ne l'est pas ou à peine.

Nous en arrivons donc aux conclusions suivantes :

Étant donné que l'alexine ne diminue que faiblement ou, dans certains cas, ne varie même nullement après le choc anaphylactique mortel de l'anaphylaxie active, il n'est pas démontré que le complément soit nécessaire à la constitution d'un poison anaphylactique qui se produirait dans le sang circulant. La variation de l'alexine paraît donc être, ainsi que l'a très justement dit Sleeswijk, un phénomène contingent et comme le font entrevoir certains travaux récents (1), il est tout aussi légitime de supposer que l'anaphylaxie peut être produite par des modifications qui se passent au sein même de la cellule, lorsque le sérum antigène arrive à son contact.

(1) Signalons, dans cet ordre d'idées, les très intéressantes recherches de Launoy et de Schultz, portant sur l'anaphylaxie cellulaire.

L. Launoy, Production et caractères du choc anaphylactique sur le cœur isolé du cobaye hypersensibilisé au sérum de cheval (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 9 mars 1912, p. 403, t. LXXII), et : Des conditions nécessaires à la démonstration du choc anaphylactique sur le cœur isolé d'animaux hypersensibilisés au sérum de cheval (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 25 mai 1912, p. 895, t. LXXII).

Schultz, Including reaction of muscle from non sensibilised, sensibilised tolerant and immunised Guinea pigs (Physiological studies on anaphylaxis). (*Hygiene Laboratory*, *Public Health and marine Hospital service of Un. States. Bull.*, 1080, 1912.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

62e ANNÉE NOVEMBRE 1912 N° 11

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR QUELQUES ESSAIS DE DÉSINTOXICATION INTESTINALE

par El. METCHNIKOFF et Eug. WOLLMAN.

(Avec la Pl. XVIII.)

INTRODUCTION

Ce mémoire ne représente qu'un anneau de la chaîne des travaux exécutés à l'Institut Pasteur dans le but d'éclaircir le problème de la flore intestinale et de ses rapports avec la dégénérescence sénile (1).

Pour répondre à la question : les microbes intestinaux sont-ils indispensables pour la vie normale des animaux? il a été entrepris une série de recherches qui peuvent être résumées en quelques mots. L'un de nous a démontré (2) qu'il est facile d'élever des mouches à l'abri des microbes et que, dans ces conditions, tout le cycle du développement de ces diptères se fait de façon absolument normale. Dans la suite, il a prouvé qu'il est possible de faire pousser des têtards de grenouille dans un milieu dépourvu de microbes. Cohendy (3) a réussi à élever des poussins dans un appareil ingénieusement construit qui permet d'éliminer toute intervention microbienne.

(1) Une note préliminaire de ce travail a été publiée dans les *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 10 juin 1912.
(2) Wollman, ces *Annales*, p. 79, 1911.
(3) *Ibid.*, p. 106, 1912.

La conclusion s'impose donc que les vertébrés supérieurs et inférieurs, ainsi que les invertébrés, peuvent très bien se passer du concours des microbes pour leur développement normal et que même les individus nouvellement éclos, chez lesquels on avait le droit de supposer l'insuffisance des ferments digestifs, peuvent se contenter de leurs propres sucs digestifs pour les besoins de leur nutrition.

Pour ce qui concerne les mammifères adultes, les roussettes (1) nous en fournissent un exemple dans lequel la digestion de la nourriture — exclusivement végétale — se fait également sans intervention des microbes, qui ne se rencontrent dans les intestins qu'en proportion tout à fait minime. Il est intéressant que, dans ces conditions, les matières fécales des roussettes ne contiennent ni indol, ni scatol, et que leurs urines ne renferment pas trace d'indoxyle ni de phénols. Ce fait fournit une nouvelle preuve de ce que ces corps aromatiques ne proviennent pas de l'attaque des albuminoïdes par l'organisme animal, mais sont, en fin de compte, le résultat de l'activité bactérienne. Etant donné qu'un certain nombre de microbes seulement sont capables de produire des phénols et de l'indol, il n'est point étonnant de rencontrer des exemples où, malgré une riche flore intestinale, l'organisme ne fournit dans ces excreta aucun des dérivés de ces substances aromatiques. Il est généralement admis que le nourrisson au sein ne contient dans ses urines ni phénols, ni indoxyle. D'un autre côté, on sait, et ce fait a été récemment confirmé par Ferdinand Blumenthal et Jacoby (2), que les lapins nourris avec des carottes ne donnent lieu à aucune production de ces substances. Mais il suffit de leur donner à manger des pommes de terre pour que l'indoxyle fasse aussitôt son apparition dans les urines. Le changement de la flore intestinale s'accomplit avec une si grande rapidité que, sans changer le genre de nourriture, il suffit de faire jeuner des lapins nourris aux carottes ou aux betteraves, pour faire apparaître dans leurs urines des quantités notables d'indoxyle. Dans ce cas, comme dans le précédent, il s'agit de la rétrocession des microbes lactiques et de l'augmen-

(1) Ces *Annales*, p. 937, 1909.
(2) *Biochemische Zeitschrift*, t. XXIX, p. 472, 1910.

tation considérable des bactéries qui attaquent les albumines et les peptones.

L'origine bactérienne des substances aromatiques mentionnées (phénols et indol étant incontestable, d'un côté, et de l'autre, leur action nuisible sur l'organisme ne pouvant plus être mise en doute, il en résulte que nous nourrissons dans notre tube digestif des ennemis qui nous causent un empoisonnement chronique. Cette dernière notion n'a pu être démontrée définitivement que tout dernièrement.

Depuis longtemps on parlait d'intoxication intestinale d'origine bactérienne, et l'on pensait généralement que la putréfaction des albuminoïdes dans le tube digestif en était la source. Plus tard cependant, on s'était cru autorisé à admettre que la putréfaction ne se produit dans les intestins qu'à un degré insignifiant et, en plus, que les produits qui en résultent ne sont pas toxiques. Ne pouvant nier la toxicité des phénols, on affirmait que la quantité qui s'en produit dans l'organisme est trop faible pour causer le moindre mal. De plus, on admettait généralement que l'organisme de l'homme et des animaux est capable de transformer les phénols et l'indol en substances inoffensives, telles que les sulfoconjugués.

Une étude plus approfondie de cette question n'a cependant pas tardé à démontrer que, bien que le phénylsulfate de potassium soit moins toxique que le phénol et le paracrésylsulfate de potassium, moins que le paracrésol, ces sulfoconjugués sont tout de même de vrais poisons, capables de faire mourir rapidement les animaux soumis à l'expérience (1).

Les phénols et l'indol, produits par certaines bactéries du tube digestif, bien qu'insuffisants pour provoquer un empoisonnement aigu, opèrent comme poisons à action lente. Des lapins et des singes, traités par l'un de nous (2) avec de petites doses de paracrésol administrées par la bouche, ont présenté, après une période de peu de mois, des altérations chroniques dans les artères, le foie et les reins. Dratchinsky (3) a exécuté

(1) Nous remercions la maison Hoffmann-Laroche pour l'amabilité avec laquelle elle a mis à notre disposition les préparations de phénylsulfate e de paracrésylsulfate de potassium.

(2) Ces *Annales*, p. 755, 1910.

(3) *Ibid.*, p. 401, 1912.

des expériences analogues avec l'indol, qu'il introduisait dans la bouche de cobayes et de singes et a obtenu le même résultat. Il se produisait à la longue des phénomènes de sclérose dans des organes précieux tels que l'aorte, le cerveau, le foie, les reins et les capsules surrénales. Wladytchko (1) a observé la prolifération des cellules névrogliques et la neuronophagie nette dans le cerveau de cobayes ayant subi l'intoxication par de petites doses d'indol.

Toutes ces lésions, dont la cause première réside dans la flore intestinale, présentent une analogie réelle avec des modifications des tissus que l'on observe dans la vieillesse. On savait, depuis longtemps, que le trait le plus caractéristique de la dégénérescence sénile consiste dans le développement de tissu conjonctif aux dépens des éléments nobles de l'organisme. De même qu'à la suite de l'ingestion de paracrésol et d'indol par des animaux, se manifestent dans la vieillesse la néphrite interstitielle chronique, un certain degré de cirrhose du foie, l'artériosclérose et l'envahissement des cellules cérébrales par des éléments névrogliques.

Tout dernièrement Salimbeni et Gery (2), de l'Institut Pasteur, ont publié un travail détaillé sur l'anatomie pathologique d'une femme, morte à quatre-vingt-treize ans, à la suite d'une gangrène pulmonaire. Dans leurs conclusions, ils insistent sur le fait que de toutes les lésions étudiées, la plus frappante et la plus générale est la sclérose, conséquence elle-même de l'infiltration mononucléaire et macrophagique. Tous les organes en présentent à des degrés divers (p. 608). Parmi les quelques organes qui ont échappé à l'investigation des auteurs mentionnés, se trouve la vessie ; or, Casper (3) a fait à ce sujet, à la Société urologique de Berlin, une communication, dans laquelle il annonce que « les lésions principales de la vessie des vieillards se reconnaissent dans la couche musculaire et consistent dans l'hyperplasie des fibres musculaires, ainsi que dans l'accroissement du tissu conjonctif intramusculaire ».

Le tableau général de l'empoisonnement chronique par les substances de la série aromatique provenant de la flore intes-

(1) *Roussky Vratch*, p. 1493, 1911 (en russe).
(2) Ces *Annales*, p. 577, 1912.
(3) *Deutsche med. Wochensch.*, p. 1522, 1912.

tinale et celui de la dégénérescence sénile, est le même : envahissement par des cellules mononucléaires et développement consécutif du tissu conjonctif.

Devant ce fait de la plus haute importance, à savoir : le rôle de certains microbes intestinaux dans l'étiologie de l'artériosclérose et de la sclérose chronique d'autres organes, il devient urgent de rechercher les moyens de combattre la production des phénols et de l'indol dans le tube digestif. Il va sans dire que nous ne prétendons pas qu'il n'y ait pas d'autres causes de ces lésions que celles qui proviennent de la flore intestinale. On a souvent constaté que certaines maladies infectieuses, notamment la syphilis, de même que l'empoisonnement chronique par le plomb, l'alcool et le tabac, amènent des altérations des artères, la néphrite interstitielle et la cirrhose hépatique. Mais il ne s'agit ici que de causes secondaires qui sont loin de présenter la constance de l'empoisonnement par les poisons intestinaux auxquels sont sujets, en dehors de l'homme, les animaux riches en microbes du tube digestif.

Les substances de la série aromatique ne sont pas les seuls poisons de la flore intestinale. L'un de nous (1) a démontré que, dans le tube digestif de l'homme, se trouvent des bacilles anaérobies protéolytiques capables de sécréter de vraies toxines. Mais jusqu'à présent il n'a pas été possible de leur attribuer quelque rôle dans les phénomènes de la dégénérescence sénile. De même, les ptomaïnes des microbes intestinaux se sont montrées incapables de provoquer ces lésions. La β-imidazonéthylamine étudiée par Berthelot et Bertrand (2), malgré son action extrêmement violente sur le cobaye, lorsqu'on l'administre par la voie intraveineuse ou sous-cutanée, est infiniment moins toxique quand on l'introduit dans l'organisme par la voie stomaco-intestinale. Ce sont donc les phénols et l'indol qui se présentent comme les facteurs les plus importants de l'auto-intoxication chronique d'origine bactérienne.

Depuis plus d'un an, nous nous sommes donc mis à étudier ces poisons provenant de la flore intestinale, dans le but de restreindre leur production dans le tube digestif et nous présentons aujourd'hui les principaux résultats de notre travail.

(1) Metchnikoff, ces *Annales*, p. 929, 1908.
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1912.

I

INFLUENCE DU RÉGIME ALIMENTAIRE SUR LA PRODUCTION DES POISONS INTESTINAUX DE LA SÉRIE AROMATIQUE (1)

Les quelques travaux exécutés dans l'intention d'établir la modification de la flore intestinale sous l'influence du changement de régime, ne visent pas les poisons aromatiques. Les causes qui règlent l'excrétion de ces substances ont été plutôt étudiées en clinique et en chimie biologique. Voici le résumé des notions acquises sur ce sujet ; nous le reproduisons d'après le traité bien connu de Neubauer et Vogel (2) : « Dans l'urine de l'homme on ne trouve que de très petites quantités de phénol. Dans les vingt-quatre heures, l'homme en excrète 0,03 grammes d'après Munk ; 0,70-0,106 grammes avec un régime mixte d'après Kossler et Penny. La quantité augmente avec la nourriture végétale ; pendant le jeûne, l'homme excrète autant de phénol qu'après avoir mangé. Dans l'urine des herbivores, on en trouve des quantités beaucoup plus grandes » (p. 148). « Chez les nourrissons nourris au sein, l'urine se présente en général, d'après Hochsinger et Momidlowski, dépourvue d'indoxyle. Mais les nourrissons qui reçoivent, en dehors du lait de femme, celui de vache et qui digèrent normalement, présentent dans leur urine d'une façon constante de petites quantités d'indoxyle. Chez l'adulte, d'après les recherches de Heller, Martin, Carter, Hoppe-Seyler, Jaffé, Senator, etc., l'indoxyle se trouve dans toute urine normale de l'homme, de même que dans celle des carnivores. Il se rencontre, en quantité très grande, dans l'urine des herbivores ; dans celle du cheval il est plus abondant que dans l'urine des bovidés, ce qui tient à la plus grande dimension du cæcum. Dans l'urine de lapins il ne se trouve pas du tout, d'après Rosin. Avec un régime mixte l'homme rend par ses urines 5 à 20 milligrammes de bleu d'indigo dans les vingt-quatre heures. Pendant le jeûne

(1) Les résultats analytiques utilisés dans cette partie de notre travail sont dus à la collaboration de Alb. Berthelot.

(2) *Anleitung zur Analyse des Harns*, rédigé par Huppert, 10e édition, Wiesbaden, 1898.

(d'après Müller, chez l'homme, mais pas chez le chien ni le chat), avec le régime végétarien prédominant (amidon, pois, d'après Fr. Müller) de même qu'après la consommation de gélatine, l'excrétion d'indoxyle est minime. Au contraire, avec une nourriture riche en albumine, notamment après consommation de viande, la quantité d'indoxyle, dans les conditions normales, atteint le maximum » (p. 162).

L'indoxyle se rencontre dans l'urine de presque tous les hommes en plus ou moins grande quantité, d'après nos propres recherches. L'absence totale de cette substance ne s'est présentée à nous qu'à titre exceptionnel, sans parler des nourrissons et des adultes placés dans les conditions particulières dont nous parlerons plus loin.

Le taux de l'indoxyle dans l'urine de vingt-quatre heures oscillait entre 0,002 et 0,211 grammes. Il est à remarquer que ces deux extrêmes se sont rencontrés chez la même personne. Pendant qu'elle mangeait beaucoup de pâtes et peu de viande, elle excrétait de très petites quantités d'indoxyle. Le maximum a été observé après le changement de régime, qui consistait dans l'abandon presque complet de farineux et dans la consommation plus grande de viande. Des fluctuations moins amples ont été remarquées chez d'autres personnes et cela malgré le même genre de nourriture. Chez un sujet au régime mixte, le taux de l'indoxyle oscillait entre 0,016 et 0,051 grammes, sans que l'on puisse préciser la cause de ce changement.

Bien qu'en général l'abondance de la nourriture animale amène une quantité assez considérable d'indoxyle (0,066-0,117 grammes), des personnes qui se nourrissent de préférence d'aliments d'origine végétale en produisent quelquefois des quantités notables. Ainsi un sujet adonné depuis des années au régime végétalien, avec exclusion de toutes sortes de viande, d'œufs et de lait, n'excrétait pas moins de 0,040 grammes d'indoxyle.

On voit par ces exemples, ainsi que par les faits concernant les mammifères mentionnés plus haut, que le problème est plus compliqué qu'on ne pouvait le préjuger. Pour l'éclaircir, il a fallu le soumettre à l'expérimentation en tâchant de le simplifier autant que possible. Le chien ne s'est montré capable de répondre qu'à quelques questions seulement. Enfermé

dans une cage (ce qui est nécessaire pour recueillir toute l'urine de vingt-quatre heures), il s'agite trop et ne se sent pas suffisamment à son aise. De plus, il résiste mal au changement de nourriture et y réagit par des troubles intestinaux. Le singe convient bien pour le régime végétal, mais ne se prête pas à l'alimentation animale. L'écureuil ne nous a renseigné que sur la valeur des noix (1). C'est le rat blanc (2) qui doit être considéré comme l'animal de choix pour les recherches qui nous intéressent ici. Omnivore dans le sens le plus large du mot, il se prête aux changements les plus brusques et les plus variés du genre de nourriture. Réunis par plusieurs dans une même cage, les rats se trouvent très bien ensemble et peuvent être nourris pendant des semaines et des mois avec le même aliment sans présenter de troubles intestinaux ni de diminution tant soit peu notable de poids. Nous n'avons observé que de rares exemples de rats qui soient morts à la suite de leur régime alimentaire.

Parmi les rats nourris pendant des semaines, exclusivement, avec un aliment unique, ceux qui recevaient de la nourriture animale (viande, œufs, fromage, poisson, mollusques, crustacés) présentaient dans leurs urines des quantités plus considérables de poisons de la série aromatique que les rats au régime végétal. Nous avons trouvé le maximum chez les rats qui mangeaient du poisson d'eau douce cuit (0,527 grammes de phénols et d'indoxyle par litre d'urine), le minimum chez ceux qui ne se nourrissaient que de fromage blanc cru (0,083 grammes par litre). Entre ces deux extrêmes oscillait le taux fourni par d'autres nourritures d'origine animale. (V. Appendice I.) Les œufs entiers, ainsi que le blanc et le jaune d'œuf servis séparément, la viande de plusieurs sortes (poulet, jambon) fournissaient presque toujours des quantités considérables de phénols et d'indoxyle.

La nourriture exclusivement végétale donnait lieu en général à une moindre production de ces corps aromatiques. Le

(1) Un écureuil nourri pendant plusieurs semaines avec des noix a donné 0,006 grammes de phénols et 0,015 grammes d'indoxyle par litre d'urine.

(2) Dans les expériences sur les rats, la quantité de substances aromatiques émises est rapportée au litre d'urine et non à l'urine de vingt-quatre heures, la quantité totale d'urine analysée étant très approximativement la même dans la plupart des expériences.

maximum que nous avons constaté s'est rencontré chez des rats nourris exclusivement avec des bananes des Canaries (0,224 grammes par litre d'urine) et chez d'autres, nourris avec des pommes de terre cuites (0,150 grammes par litre), tandis que le minimum de ces poisons a été observé chez des rats qui ne mangeaient que du pain blanc (0,0056 grammes par litre). En comparant ces chiffres, on remarque que quelques aliments végétaux peuvent produire plus de poisons que certains aliments d'origine animale tels que le fromage blanc. Entre les deux valeurs extrêmes que nous venons d'indiquer, nous avons trouvé toute une échelle de taux de phénols et d'indoxyle après l'ingestion de divers aliments végétaux. (V. Appendice II.) Nous signalerons ici que les aliments riches en sucre, tels que betteraves, navets, carottes, dattes, amènent en général un faible rendement en ces poisons. La seule exception que nous avons observée se rapporte aux bananes qui dans quelques expériences se sont montrées capables de provoquer une forte production de poisons aromatiques.

Après nous être ainsi orientés sur la production de ces poisons, à la suite de l'ingestion d'un seul aliment végétal, nous avons essayé de combiner plusieurs aliments soit entre eux, soit avec des aliments d'origine animale. En donnant à manger à nos rats des pommes de terre (qui dans beaucoup de cas provoquent un fort rendement d'indoxyle et de phénols) mélangées avec des dattes, nous avons obtenu la disparition de l'indoxyle, tandis que les phénols continuaient à être produits en quantité notable. La combinaison de deux aliments végétaux qui nous a donné la plus faible quantité de poisons aromatiques, était constituée par du pain blanc mélangé avec de la betterave (0,005 grammes par litre). Les autres combinaisons employées par nous n'ont jamais dépassé le taux de 100 milligrammes par litre. (V. Appendice III.)

Le mélange de trois aliments d'origine végétale donnait lieu à une plus forte production de ces poisons que celui qui ne comprenait que deux sortes de nourriture. Le taux de 100 milligrammes par litre était dépassé chez des rats nourris avec un mélange de millet décortiqué, de sarrazin et de beurre. Les combinaisons dans lesquelles entraient des aliments végétaux et du lait donnaient un rendement inférieur. (V. Appendice IV.)

En dernier lieu, nous avons essayé de combiner quatre sortes d'aliments. Des rats nourris avec un mélange de jambon, de pommes de terre, pris comme forts producteurs de poisons aromatiques, additionnés de betteraves et de dattes agissant dans le sens contraire, excrétaient dans leurs urines au commencement de ce régime une quantité assez considérable de phénols et d'indoxyle. Mais avec le temps le taux de ces poisons diminua d'une façon notable (0,018 au lieu de 0,123 grammes par litre).

Le fait que nous venons de signaler est loin d'être unique. Nous avons remarqué plusieurs fois que les mêmes rats, nourris avec les mêmes aliments, ne rendaient pas toujours la même quantité de phénols et d'indoxyle. Tantôt le taux de ces poisons diminuait, comme dans le cas que nous venons de mentionner. Mais quelquefois il présentait une augmentation avec le même régime et sans qu'il soit possible de préciser le déterminisme de ce changement. Il est évident que, bien que le genre de nourriture exerce un rôle considérable dans la production de poisons de la série aromatique, il existe d'autres causes encore qui l'influencent. Ce sont certainement les microbes intestinaux et leurs diverses combinaisons qui entrent en jeu. C'est leur fonctionnement qui doit expliquer pourquoi, dans certains cas exceptionnels, même les aliments donnant le plus fort rendement en phénols et indoxyle, peuvent être absorbés sans qu'il y ait production de ces substances. L'exemple le plus remarquable est le jaune d'œuf, qui constituait, pendant des semaines, l'aliment unique de nos rats. Tandis qu'en général il fournissait beaucoup de poisons aromatiques, dans un cas, il n'en provoquait qu'une production minime (0,0025 gr. par litre), inférieure à celle que l'on observe chez des rats nourris avec des aliments végétaux.

Il est bien connu que la flore intestinale de l'homme et des animaux est très variable et présente des modifications individuelles considérables. Ce n'est que chez les nourrissons au sein qu'elle est presque toujours la même, constituée, pour la plus grande partie, par le *Bacillus bifidus* de Tissier. Mais à partir du sevrage, le nombre des espèces bactériennes augmente beaucoup, et c'est alors que les variations individuelles de la flore intestinale se manifestent de plus en plus fortes. Dans ces con-

ditions, il devient bien difficile de parler de « flore normale » de l'homme et de la plupart des animaux (1).

Des rats, nourris avec le même aliment unique et logés ensemble dans la même cage, présentaient des différences très accusées dans leur population microbienne intestinale. Ainsi, parmi des rats qui ne recevaient comme aliment que des œufs cuits durs, les matières fécales neutres chez les uns, faiblement acides ou fortement alcalines chez d'autres, présentaient un tableau de la flore intestinale sensiblement différent. Quelquefois prédominaient de gros bacilles courts prenant le *Gram*, mélangés avec de petits coccobacilles qui se décolorent par cette méthode et qui en grande partie sont représentés par des coccobacilles Proteus (fig. 1). Chez d'autres rats au même régime, la flore était plus riche en espèces. A côté d'un grand nombre de *Bacillus sporogenes* se trouvaient des Proteus, beaucoup de staphylocoques et de minces bacilles colorables par le *Gram* (fig. 2). Chez un autre rat du même lot, au lieu de petits coccobacilles, se rencontraient une quantité de bacilles ne prenant pas le *Gram* (qui sont pour la plupart des colibacilles) et des bâtonnets très minces qui se colorent par cette méthode (fig. 3).

L'ensemencement des matières fécales de ces rats au régime des œufs durs, dans les milieux nutritifs usités de laboratoire, amenait une sorte de sélection selon les particularités de ces milieux. En gélose sur des boîtes de Petri se développait toujours et surtout le colibacille, tandis que sur des tubes de gélose inclinée, ensemencés dans l'eau de condensation (méthode de Choukevitch), poussait le Proteus qui, en peu de temps, montait jusqu'à l'extrémité de la gélose. La gélose profonde, ensemencée avec des matières fécales, fournissait beaucoup de colonies de *Bacillus Welchii* (*Perfringens*) que l'on ne rencontrait qu'en petit nombre sur des frottis des matières. A côté de ce microbe, les tubes de gélose profonde présentaient des colonies du *Bac. sporogenes* qui produisait une grande quantité d'indol, et cinq autres espèces bactériennes (parmi lesquelles une anaérobie facultative) qui toutes ne donnèrent pas d'indol. Parmi

(1) La flore des rats au régime ordinaire (graines) et au régime carné avait été étudiée par de Gasperi (*Centralbl. f. Bakt.*, 1911.)

ces dernières, la plus remarquable est un bacille anaérobie strict ne prenant pas le *Gram* et très polymorphe : il se présente tantôt sous forme de bâtonnets et de filaments, tantôt sous forme globuleuse.

Il suffit de jeter un coup d'œil comparatif sur deux tubes, dont l'un contient l'indoxyle extrait de l'urine de rats nourris aux œufs, tandis que l'autre renferme l'indoxyle de rats nourris exclusivement avec des dattes, pour être aussitôt frappé d'une grande différence entre eux. Au contraire, l'examen de frottis des matières fécales de ces deux catégories de rats n'accuse que des variations bien moins considérables. Quelquefois, on est impressionné par la prédominance de la flore colorable par la méthode de *Gram*, dans laquelle se rencontrent surtout des coccobacilles lactiques du groupe des entérocoques (fig. 4). Mais dans le même lot de rats, vivant dans la même cage et alimentés, comme les premiers, seulement de dattes, on en rencontre dont la flore intestinale est particulièrement riche en coccobacilles ne prenant pas le *Gram* et renfermant une assez grande quantité de *Bac. bifidus*. Les formes à entérocoque ne constituent qu'une faible minorité (fig. 5).

Comme exemple de rats ne produisant que très peu de poisons de la série aromatique, nous avons choisi ceux qui ont été nourris exclusivement avec des carottes. Sur les frottis de leurs déjections, on rencontre (fig. 6) une quantité de bactéries incurvées fusiformes, quelquefois extrêmement fines. Elles prennent mal la coloration de *Gram* et se décolorent avec une très grande facilité. Les tentatives faites pour les cultiver n'ont pas donné jusqu'à présent de résultat. On voit ensuite un gros bacille à extrémités arrondies, très probablement identique au *Bacillus capillosus* de Tissier, et des coccobacilles ne prenant pas le *Gram*, parmi lesquels on distingue le colibacille et le Proteus. En dehors de ces microbes, on rencontre plusieurs bactéries qui se colorent par le *Gram* et parmi lesquelles on reconnaît beaucoup de diplo- et de streptocoques, et de gros bacilles acidophiles à bouts arrondis.

Les cultures, sur les milieux les plus usuels en bactériologie, appartiennent en grande partie au bacille acidophile du type Merechkowsky, qui pousse très abondamment dans des tubes de gélose profonde (d'après Veillon). Il s'agit ici certainement

de la variété du *Bac. exilis* de Tissier. L'acidophile de Moro est beaucoup plus rare. On l'obtient facilement en ensemençant les matières dans du bouillon acide. Le *Bac. bifidus* forme le 1/5-1/6 du nombre total des colonies. Les cultures en gélatine sur des boîtes de Petri laissent voir surtout des colibacilles, des Proteus et des *Bac. fluorescens liquefaciens*. En outre de ces microbes, nous en avons isolé encore trois autres : le *B. ventriosus* de Tissier, un streptocoque anaérobie prenant le *Gram* et ne donnant pas d'indol, de même qu'un fin bacille anaérobie, formant des chaînettes disposées en tresses et n'attaquant pas les albuminoïdes.

En comparant la flore des rats aux œufs et aux carottes, nous voyons que les différences portent surtout sur les points suivants. L'abondance du *B. Welchii*, du *B. sporogenes* et du bacille polymorphe caractérise la flore intestinale des rats nourris avec des œufs. Chez les rats aux carottes, ce sont les acidophiles et le *bifidus* qui prédominent, tandis que chez les rats aux œufs on ne peut isoler le premier qu'en passant par le bouillon acide. Le grand producteur d'indol, le colibacille, est commun aux deux régimes, de même que le Proteus. La grande différence dans la production de l'indol doit donc être attribuée aux quantités proportionnelles des espèces qui constituent la flore intestinale, et non à la différence qualitative de cette flore.

D'après l'ensemble de données que nous avons pu réunir, on peut conclure que le régime alimentaire ne constitue qu'un des facteurs qui agissent dans la production des poisons de la série aromatique. Le second facteur, et des plus importants, est représenté par les bactéries de la flore intestinale.

II

INFLUENCE DE QUELQUES MICROBES SUR LA PRODUCTION DES POISONS INTESTINAUX DE LA SÉRIE AROMATIQUE

Bien avant la série de recherches que nous avons relatées dans ce mémoire, on a essayé de modifier notre flore intestinale à l'aide de microbes lactiques. Cette tentative était appuyée sur deux principes. D'un côté, on avait tout lieu de croire que les putréfactions intestinales constituaient une source impor-

tante de troubles aigus et chroniques et que, partant, les ferments lactiques pouvaient les diminuer ou même les supprimer. D'un autre côté, on se basait sur le fait que, parmi les populations qui consomment beaucoup de lait aigri, on rencontre, plus souvent que d'habitude, des vieillards bien conservés et même un plus grand nombre de centenaires. En plus des exemples mentionnés dans un autre endroit (1), nous pouvons citer quelques autres cas parvenus à notre connaissance. Un vétérinaire du territoire de Koubane (dans le Caucase du nord), M. Atmanskikh, nous a envoyé une brochure sur l'industrie laitière dans son pays, dans laquelle il annonce que « les produits de laitage constituent la nourriture principale et constante de la population ». Parmi ces produits, le plus remarquable porte le nom d' « aïran » : c'est une sorte de lait aigri préparé avec du lait bouilli auquel on ajoute, lorsqu'il est devenu tiède, quelques cuillerées d'un levain renfermant deux microbes lactiques (un long bacille et un streptobacille en chaînettes) et une levure. « Pour les habitants du district Karatchaï (du territoire de Koubane), l'aïran représente le principal produit alimentaire; c'est l'unique nourriture de beaucoup de familles ». « Il n'est pas rare que l'aïran, pendant des semaines, constitue la seule nourriture. L'indigène du pays reste souvent sans pain et sans viande, mais d'aïran et de fromage il ne peut se passer, ni à la maison, ni au dehors » (p. 7). Comme résultat de ce régime, il est à signaler que « les habitants de Karatchaï jouissent d'une santé florissante et atteignent souvent une vieillesse très avancée » (p. 11). Aussi les médecins recommandent beaucoup l'aïran à leurs patients atteints de troubles gastro-intestinaux. Dans un pays du district de Karatchaï, pays qui s'appelle Tiberda, une grande quantité de malades s'empressent en été. Il s'est même formé dans cet endroit un village composé de villas, remplies de malades qui suivent la cure d'aïran. Comme corollaire à sa brochure, M. Atmanskikh nous a envoyé la photographie de deux beaux vieillards qui prétendent, tous les deux, avoir atteint l'âge de cent trente ans et qui habitent précisément Tiberda. Etant donné qu'au temps où sont nés ces deux hommes, il n'existait

(1) Metchnikoff, *Essais optimistes.* Paris, 1907, p. 227 et suiv.

pas encore dans le pays de registre d'état civil, ce n'est que d'après des renseignements verbaux sur les événements de cette époque reculée que l'auteur de la brochure conclut que les deux vieillards sont « incontestablement âgés de plus de cent ans ». Les deux vieillards, dont le physique donne une bonne impression, ont eu une nouvelle poussée de dents après la chute des anciennes.

Dans le récit de son voyage dans la Guinée française, Mme Pobéguin (1) signale le fait que, dans la région qu'elle a parcourue, les nègres qui mangent beaucoup de lait aigri se distinguent par leur bonne santé et atteignent fréquemment un âge très avancé.

M. le Dr d'Hérelle écrit ce qui suit, dans une lettre adressée de la province de la Rioja (nord-ouest de la République Argentine) : « La longévité est extraordinaire dans cette région. Il n'y a pas de petit village qui ne compte un ou deux centenaires, et bien des vieillards de quatre-vingts et quatre-vingt-dix ans cultivent la terre comme s'ils avaient trente ans et font leurs dix lieues à cheval sans se fatiguer. Ce qu'il y a de particulier, c'est que le fond de l'alimentation dans ces campagnes est une espèce de lait caillé, tout comme en Bulgarie. J'ai constaté d'abondants ferments lactiques dans les fèces de deux vieux de quatre-vingt-quatorze et quatre-vingt-dix-sept ans particulièrement robustes. »

Bien que le manque de documents statistiques laisse imprécise l'évaluation de l'âge des vieillards, il ne peut être douteux que dans ces exemples, de même que dans les cas de longévité des Bulgares et de quelques autres habitants des Balkans, il s'agit réellement d'hommes très vieux. La femme serbe, mentionnée dans notre introduction, qui nous a été adressée comme centenaire, ne l'était pas; cependant, d'après des renseignements plus précis, son âge avait atteint quatre-vingt-treize ans.

L'effet bienfaisant des ferments lactiques dans les maladies du tube digestif, notamment dans celles que cause la putréfaction intestinale, est admis d'une façon si générale qu'il est inutile d'entrer de nouveau dans les détails. Même chez les petits

(1) *Le Tour du Monde*, 1912.

enfants, les microbes lactiques exercent une action thérapeutique marquée. Parmi les documents les plus récents à ce sujet signalons une note du Dr R. Clock (1). Après avoir constaté que le babeurre, que l'auteur employait beaucoup autrefois, n'agit que d'une façon passagère, il s'est décidé à prescrire aux petits enfants atteints de troubles digestifs des cultures pures du bacille bulgare. « Dans chaque cas, le succès ne s'est pas fait attendre longtemps. Le processus putréfactif de l'intestin diminua, ce qui se manifestait par les propriétés normales des matières fécales. L'action curative doit être attribuée exclusivement aux bacilles, car on n'a pas employé d'autres mesures thérapeutiques ou diététiques. »

Il reste encore beaucoup à étudier pour préciser le mécanisme intime de l'action thérapeutique des microbes lactiques dans le tube digestif. Il est plus facile de s'en rendre compte d'après l'examen de leur effet curatif dans des maladies d'organes moins profonds. Le Dr Brindeau a publié récemment (2) un travail détaillé sur 95 cas de traitement d'infection puerpérale avec des cultures pures de ferment bulgare, additionné de lactose stérile. Arrivé à un résultat très favorable, l'auteur conclut en ces termes : « Le traitement des plaies infectées par les cultures du bacille lactique donne de bons résultats. Il est logique, car l'acide lactique est un antiseptique puissant et non toxique. Les cultures agissent, en outre, en empêchant certaines espèces pathogènes et en provoquant la leucocytose. Il n'est pas dangereux, car ce microbe n'est jamais pathogène. Les cultures lactiques peuvent être employées dans tous les cas de plaies septiques ou putrides, mais leur véritable indication se trouve dans les plaies vulvo-périnéales infectées secondaires à l'accouchement. Ces plaies se détergent très rapidement et ce traitement est un excellent moyen de préparation pour les restaurations secondaires du périnée » (p. 15). Il serait intéressant d'établir la variation du taux de l'indoxyle chez les femmes traitées avec des bacilles bulgares. Etant donné que la suppuration constitue une source d'indol, il serait facile de démontrer la diminution d'indoxyle urinaire sous l'influence de ferments lactiques.

(1) *Journal of the americ. medic. assoc.*, 1912, 29 juin.
(2) *Archives mensuelles d'Obstétrique et de Gynécologie*, 3 mars 1912.

Pierre Rosenthal et M. Berthelot (1) ont obtenu la guérison de gingivites et de pyorrhées alvéolaires rebelles à l'aide de cultures pures de microbes lactiques. Depuis 1908 L. Fournier (2) emploie avec succès le bacille bulgare dans le traitement des infections du pharynx et des fosses nasales. M. Berthelot (*ibid.*), après avoir démontré que ce bacille est capable d'empêcher le développement du méningocoque, pense qu'on pourrait peut-être débarrasser les fosses nasales et le pharynx de ce microbe si dangereux en introduisant dans ces cavités une suspension de bacilles bulgares dans du lactosérum. On a pensé aussi qu'il était possible par le même moyen d'éliminer les bacilles typhiques et paratyphiques chez des porteurs de ces germes pathogènes. Malgré quelques cas favorables, les tentatives dans cette voie n'ont pas été couronnées de succès. La cause de cette inégalité dans l'action des ferments lactiques nous paraît résider dans la grande différence des conditions extérieures qui les entourent. Tandis qu'il est facile d'introduire des matières sucrées, indispensables pour ces ferments, dans les fosses nasales, le pharynx et le vagin, il n'est point aisé de les faire parvenir dans les régions profondes du tube digestif, telles que l'iléon, le cæcum et le côlon. Il est bien établi que les sucres se résorbent si facilement dans l'estomac et dans les parties supérieures de l'intestin grêle, qu'il n'en passe rien ou presque rien dans les parties plus profondes.

M. Berthelot (3) a fait à ce sujet des recherches multiples d'après lesquelles les sucres introduits avec des aliments riches en ces hydrocarbonnés, carottes, betteraves, raisins secs et dattes, ne parviennent qu'en certaine quantité dans le cæcum du lapin et n'arrivent qu'en quantité très faible dans le cæcum et le côlon ascendant des macaques. Dans le contenu de la partie supérieure du gros intestin, on n'a retrouvé que peu de sucre chez le lapin et seulement des traces dans le contenu des côlons transverse et descendant du singe. D'où cette conclusion que, pour introduire des matières sucrées dans le gros intestin, « d'assez nombreux aliments pourraient être employés, mais, parmi eux, les dattes paraissent le mieux convenir à cause de

(1) *Bull. de la Soc. thérapeutique*, 8 avril 1908; *Revue de Médecine*, 10 août 1910.

(2) Berthelot. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 19 mars 1910.

(3) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 8 janvier 1910.

leur grande richesse en sucres, de leur faible teneur en eau et de la texture serrée de leur parenchyme. Après elles, on peut recommander, entre autres, les raisins secs, les racines comme la carotte ou la betterave, possédant tous une teneur en sucres assez élevée ».

Le fait signalé plus haut, que les lapins nourris de carottes et de betteraves n'excrètent que des quantités minimes ou même pas du tout d'indoxyle, s'explique facilement par la pénétration plus abondante de sucres dans le gros intestin, siège de la putréfaction intestinale. Chez le singe et chez l'homme, les conditions sont moins favorables sous ce rapport. Il y avait donc tout lieu de chercher quelque autre source de matières sucrées dans le gros intestin. Dans cette intention, l'un de nous (1) a eu l'idée de faire produire par des microbes intestinaux du sucre aux dépens des aliments amylacés.

Il est bien connu que les matières fécales d'hommes au régime végétarien ou mixte contiennent toujours ou presque constamment des restes d'amidon. On en trouve surtout après un repas de pommes de terre dont les membranes cellulosiques protègent les grains d'amidon de la digestion complète. Mais, même après des repas de riz ou de graines de féculents, une partie de l'amidon traverse le tube digestif entier et passe dans les matières fécales (2).

Bien que les microbes capables de produire du sucre avec de l'amidon ne soient pas rares dans la nature, il a fallu un travail prolongé et laborieux pour arriver à quelque résultat précis. Aussi l'un de nous (3) a cherché plus d'un an avant d'aboutir. La plupart des microbes amylolytiques attaquent en même temps les substances albuminoïdes, ce qui a pour résultat qu'introduits dans le tube digestif, ils favorisent la putréfaction intestinale plutôt qu'ils ne l'empêchent. Ce n'est qu'avec un bacille isolé des matières fécales d'un chien qui servait pour l'étude de l'influence du régime alimentaire sur la production de corps de la série aromatique, qu'il a été possible d'obtenir une action amylolytique marquée non accompagnée d'une

(1) Metchnikoff, *Bactériothérapie intestinale*, Gilbert et Carnot, 2e édit., p. 40, 1912.

(2) Schmidt und Strasburger, *Die Fäces des Menschen*, 3e édit., p. 76, Berlin, 1910.

(3) Wollman, Ces *Annales*, p. 610, 1912.

attaque d'albumine et de gélatine. C'est avec ce bacille désigné sous le nom de *Glycobacter peptolyticus*, que nous avons fait plusieurs séries d'expériences afin d'établir son influence sur la production des phénols et de l'indol dans l'organisme. Nous avons d'abord pris des rats auxquels nous donnions divers aliments farineux, tels que pain, riz, pommes de terre, additionnés de culture pure du glycobacter. Ce n'est qu'avec des pommes de terre que nous avons obtenu des résultats encourageants, ce qui tient probablement à la protection plus efficace des grains d'amidon par la membrane plus dense des cellules qui les renferment. Dans quelques-unes de nos expériences le bacille amylolytique faisait disparaître des urines les phénols, de même que l'indoxyle; dans d'autres, l'effet, quoique moins complet, était néanmoins bien marqué. Ce n'est que dans des cas rares que l'absorption du glycobacter n'exerçait qu'une influence minime ou nulle (V. Appendice V.) Les macaques nourris aux pommes de terre produisent parfois des quantités tellement considérables de poisons aromatiques qu'il devient difficile de les diminuer d'une façon tant soit peu notable. Mais dans d'autres cas où cette production n'est pas exagérée, le glycobacter s'est montré capable d'assurer ce résultat.

L'effet le plus marqué a été observé chez plusieurs personnes qui se trouvent parmi les sujets qui, habituellement, donnent un rendement plus ou moins considérable de phénols et d'indoxyle dans leurs urines. D'une façon régulière, à quelques exceptions près, nous avons obtenu chez eux une diminution plus ou moins accusée à la suite de l'absorption de pommes de terre additionnées de glycobacter. (V. Appendice VI.)

Après avoir établi que, d'un côté, le régime approprié et, de l'autre, l'addition de certains microbes, exercent une influence favorable dans le sens de la diminution des poisons aromatiques d'origine microbienne, nous nous sommes mis à combiner ces deux facteurs. Nous avons pris un lot de onze rats recevant ensemble par jour un mélange de jambon (60 grammes), pommes de terre (120 grammes), betteraves (120 grammes) et dattes (60 grammes). Au début de ce régime ils rendaient avec leurs urines des quantités assez notables de phénols et d'indoxyle; mais dans la suite le taux de ces poisons accusait une diminution marquée sous l'influence des aliments riches

en sucre. Ce n'est qu'après l'addition à leur nourriture de cultures pures de ferments bulgares et de glycobacters peptolytiques que nous avons obtenu leur disparition presque complète. (V. Appendice VII.)

Il est donc possible d'obtenir un régime mixte nutritif duquel la viande n'est point exclue et qui ne provoque qu'une production de poisons aromatiques tout à fait insignifiante. Chez l'homme, nous sommes arrivés à un résultat semblable. Un de nous, qui se distinguait pendant longtemps par un fort rendement d'indoxyle urinaire, auquel, à cette époque, étant donnée l'opinion générale sur l'innocuité de cette substance, il n'attachait pas d'importance, s'est mis plus tard à rechercher un régime hygiénique capable d'en amener la suppression. Dans cette intention, il combinait différents aliments additionnés de microbes bienfaisants. Il s'est trouvé qu'un régime mixte dans lequel entrait une certaine quantité de viande ou de poisson (100 à 120 grammes), des farineux, légumes verts et secs, fruits en compote, diverses sucreries, et 500 à 600 grammes de lait aigri par le bacille paralactique, un tube de culture pure du bacille bulgare sous forme de pâte — tout cela réparti entre les trois repas de la journée — supprima l'excrétion de l'indoxyle. Il arrivait bien que dans quelques portions de l'urine on remarquât encore une légère trace d'indigo, mais les urines de vingt-quatre heures en étaient presque constamment dépourvues.

Un voyage de deux mois en Russie changea notablement le régime alimentaire et, partant, le rendement des poisons aromatiques redevint assez abondant. Il a fallu plus de deux autres mois pour arriver à leur suppression à l'aide du régime mentionné. L'indoxyle, devenu de plus en plus rare, a fini par disparaître. Une analyse quantitative faite environ onze mois après le retour, démontre une trace indosable d'indoxyle et trois à quatre milligrammes de phénols dans l'urine de vingt-quatre heures, c'est-à-dire une quantité insignifiante en comparaison du taux normal, indiqué au début du premier chapitre de ce mémoire. Etant donné ce résultat, il a été inutile dans cet exemple de recourir à l'action du glycobacter.

Plusieurs personnes de notre entourage qui, normalement, rendaient des quantités plus ou moins considérables d'indoxyle,

l'ont vu disparaître après avoir suivi pendant quelques semaines ou plusieurs mois un régime analogue au régime sus-mentionné. N'ayant pas à notre disposition de service hospitalier ou policlinique, nous n'avons pas pu multiplier le nombre de nos observations, mais il est désirable que cette lacune soit comblée dans de bonnes conditions.

Nous n'avons pas la prétention de penser que notre travail épuise le problème si complexe des rapports de la flore intestinale avec l'intoxication chronique qui cause les scléroses de nos organes les plus précieux. Nous espérons seulement avoir fait quelques pas vers ce but. Un long travail est encore à poursuivre. Il y a lieu, grâce au perfectionnement des méthodes d'isolement et de culture des microbes, d'étudier la flore intestinale dans des cas où les poisons de la série aromatique ne sont produits qu'en quantité très faible, malgré les régimes les plus variés, souvent riches en albuminoïdes animales. Les conditions de la lutte entre les microbes du tube digestif, souvent si difficiles à établir, doivent être étudiées avec beaucoup de précision.

La putréfaction intestinale n'étant pas l'unique source de poisons intestinaux, il serait utile d'établir le rôle des fermentations acides dans les auto-intoxications. Bien que l'exemple des peuples qui, pendant presque toute leur vie, se nourrissent avec du lait aigri, prouve l'innocuité des ferments lactiques, des expériences directes doivent être dirigées dans cette voie. Il faut établir encore l'influence des différents régimes sur la longévité des animaux et de l'homme, ce qui est surtout facile en s'adressant aux petits omnivores, tels que les rats blancs, dont le cycle de vie est particulièrement court. Des recherches dans ces directions sont poursuivies dans notre laboratoire.

APPENDICES

I. — Urine des rats nourris avec un seul aliment d'origine animale.

Nos d'ordre.	NOM de l'aliment.	DATE	QUANTITÉ d'urine en c.c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
1	Œufs entiers cuits durs.	30 oct. 1911.	235	1,052	0,165	0,200
2	Idem.	10 janv. 1912.	300	1,052	0,030	0,068
3	Blanc d'œuf cuit dur.	27 janv. 1912.	85	1,055	0,033	0,300
4	Idem.	6 févr. 1912.	350	1,055	»	0,460
5	Jaune d'œuf cuit dur.	19 mars 1912.	260	1,053	0,120	0,178
6	Idem.	25 avril 1912.	250	1,041	0,002	Indosable.
7	Jambon cuit.	21 mars 1912.	250	1,055	0,004	0,250
8	Poulet cuit.	1er mars 1912,	270	1,053	0,150	0,357
9	Viande de cheval et de bœuf cuites.	30 sept. 1912.	225	1,042	»	0,107
10	Poisson cru.	11 nov. 1911.	300	1,060	0,090	0,084
11	Fromage blanc.	30 avril 1912	280	1,035	0,050	0,033
12	Idem.	7 mai 1912.	185	1,051	0,100	0,017
13	Idem.	21 mai 1912.	225	1,061	0,090	0,013
14	Moules cuites.	13-28 août 1912.	260	1,055	0,125	0,215
15	Idem.	3 sept. 1912.	260	1,048	0,133	0,111
16	Crevettes.	13 sept. 1912.	260	1,050	0,002	0,040

II. — Urine des rats nourris avec un seul aliment d'origine végétale.

1	Carottes cuites.	26 nov. 1911.	138	»	0,008	0,006
2	Idem.	10 janv. 1912. 15 sept. 1912.	300	1,031	»	0,008
3	Idem.	21 sept. 1912.	250	1,027	0,033	0,004
4	Pommes de terre cuites à l'eau.	15 nov. 1911.	370	1,031	0,080	0,070
5	Idem.	3 déc. 1911.	300	1,040	»	0,096
6	Idem.	1er janv. 1912.	280	1,040	0,020	0,059
7	Idem.	19 janv. 1912.	300	1,044	0,019	0,041
8	Idem.	28 févr. 1912.	200	1,030	0,014	0,066

Nos d'ordre.	NOM de l'aliment.	DATES	QUANTITÉ d'urine en c. c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
9	Pommes de terre cuites à l'eau.	28 févr. 1912.	265	1,023	0,012	0,037
10	Idem.	Août 1912.	300	1,034	»	0,012
11	Idem.	»	300	1,028	»	0,008
12	Idem.	Sept. 1912.	275	1,019	0,010	0,001
13	Purée de pommes de terre.	15 juin-1er juil. 1912.	290	1,029	0,016	0,006
14	Idem.	2-9 juil. 1912.	500	1,034	»	0,008
15	Bananes.	18 avril-14 mai 1912.	190	1,068	0,224	0,122
16	Idem.	16 mai-8 juin 1912.	240	1,036	0,014	0,003
17	Idem.	18 avril 1912.	235	1,055	0,010	Indosable.
18	Idem.	10 juin 1912.	250	1,046	»	0,002
19	Idem.	21 juin 1912.	275	1,027	0,028	0,038
20	Idem.	21 juil. 1912.	300	1,043	0,034	0,014
21	Idem.	Août 1912.	270	1,065	0,006	Indosable.
22	Choux-fleurs bouillis.	16 mai 1912.	150	1,036	0,016	0,002
23	Purée de pois.	13 mai 1912.	162	1,056	0,020	0,003
24	Dattes.	11 janv. 1912.	135	1,070	0,008	0,006
25	Pain blanc.	23 avril-9 mai 1912.	170	1,028	0,006	0,004
26	Idem.	10-15 mai 1912.	200	1,031	0,006	0
27	Idem.	16-20 mai 1912.	180	1,026	0,013	0,003
28	Idem.	20 mai-3 juin 1912.	140	1,030	0,006	Indosable
	III. — Urine des rats nourris avec deux aliments.					
1	Poisson d'eau douce cuit au beurre.	15 juin au 1er sept. 1912.	260	1,063	0,100	0,033
2	Maquereau cuit au beurre.	17 sept. 1912.	250	1,052	0,200	0,032
3	Poisson cuit au beurre.	15 juin-16 juil. 1912.	110	1,070	»	0,125
4	Pain et betterave bouillie.	27 févr. 1912.	300	1,053	0,005	0
5	Idem.	28 févr.-26 mars 1912.	355	1,052	0,005	0
6	Idem.	27 mars-18 avril 1912.	450	1,033	»	0
7	Pain et sucre.	28 janv.-20 avril 1912.	235	1,053	0,066	0
8	Pommes de terre et dattes.	19 mars 1912.	250	1,053	0,038	0

Nos d'ordre.	NOM des aliments)	DATE	QUANTITÉ d'urine en c.c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
9	Pommes de terre et dattes.	25 avril 1912.	260	1,037	0,100	Indosable.
10	Pommes de terre beurre.	15 juin-1er juillet 1912.	290	1.029	0,004	0.006
11	Idem.	15 août-1er sept. 1912.	280	1,027	0,015	0,008
12	Idem.	13 août.	375	1,020	0,013	0,001
13	Idem.	13 sept. 1912.	290	1,025	0,007	0,006
14	Purée de pommes de terre, beurre.	»	500	1,034	»	0,007
15	Idem.	»	220	1,016	0,008	0,007
16	Idem.	13 sept. 1912.	290	1,022	»	0,006
17	Macaroni, beurre.	30 mai-13 juin 1912.	220	1,018	0,005	0,008
18	Idem.	14 juin-10 juillet 1912.	260	1,018	0,050	0,014
19	Idem.	3-13 juin 1912.	250	1,027	0,035	0,009
20	Semoule au lait.	14-20 juin 1912.	220	1,025	»	0,029
21	Farine de maïs avec beurre.	15-19 juin 1912.	205	1,012	0,010	0,018
22	Idem.	20 juin-20 juil. 1912.	425	1,015	0,050	0,017
23	Idem.	10-20 juil. 1912.	590	1,016	»	0,011
24	Idem.	29 juillet-2 août 1912.	300	1,009	»	0,002
25	Petits pois avec beurre.	5-17 juin 1912.	195	1,021	»	0,011
26	Idem.	18 juin-2 juil. 1912.	180	1,047	Indosable.	Indosable.
27	Haricots verts beurre.	13 août-1er sept. 1912.	285	1,023	»	0,042
28	Navets cuits beurre.	13-28 août 1912.	260	1,023	0,015	0,002
29	Idem.	»	300	1,017	0,034	0,010
30	Idem.	5 sept. 1912.	300	1,021	0,002	0,006
31	Idem.	»	260	1,021	0,023	0,037
32	Idem.	14 sept. 1912.	260	1,015	0,015	Indosable.
33	Cerises, abricots.	30 mai-8 juin 1912.	275	1,024	0,010	0,021
34	Idem.	8-15 juin 1912.	185	1,013	0,012	0,004
35	Citrouille, beurre.	»	380	1,019	0,029	0,046
36	Idem.	13 sept. 1912.	290	1,013	0,031	0,010
37	Haricots verts, beurre.	9 sept. 1912.	310	1,015	»	0,010

IV. — **Urine des rats nourris avec trois aliments divers.**

Nos d'ordre.	NOM de l'aliment.	DATE	QUANTITÉ d'urine en c. c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
1	Riz, lait, sucre.	21 mars-18 avril 1912.	370	1,012	0,011	0,0021
2	Idem.	19 avril-14 mai 1912.	195	1,018	0,080	0
3	Idem.	15 mai-3 juin 1912.	310	1,013	0,040	0,042
4	Millet et sarrazin, décortiqués, beurre.	30 mai-11 juin 1612.	245	1,016	0,111	0,009
5	Idem.	12-24 juin.	290	1,016	0,100	0,042
6	Idem.	30 juin-9 juil. 1912.	280	1,027	»	0,042

V. — **Urine des rats nourris avec des pommes de terre. Influence du glycobacter peptolyticus.**

Nos d'ordre.	NOM de l'aliment.	DATE	QUANTITÉ d'urine en c. c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
1	Pommes de terre cuites	15 nov. 1911.	370	1,030	0,080	0,070
2	Mêmes rats qu'au n° 1, nourris avec des pommes de terre cuites, additionnées de culture pure de glycobacter peptolytieus.	27 déc. 1911.	300	1,035	Indosable.	0
3	7 rats nourris aux pommes de terre cuites.	3 décembre 1911.	500	1,036	»	0,096
4	Mêmes rats aux pommes de terre et glycobacter.	27 décembre 1911.	380	1,026	0,022	0,058
5	6 rats aux pommes de terre cuites.	13 décembre 1912.	500	1,038	0,020	0,059
6	Mêmes rats aux pommes de terre et glycobacter.	31 décembre 1912.	280	1,040	0,010	0,024
7	Pommes de terre.	19 déc. 1911.	300	1,036	0,019	0,041
8	Pommes de terre et glycobacter.	12 janvier 1912.	300	1,035	0,015	0,015
9	Pommes de terre.	Février 1912.	200	1,027	0,014	0,066
10	Mêmes rats, pommes de terre et glycobacter.	Février 1912.	300	1,026	0,013	0,029
11	Pommes de terre.	Février 1912.	265	1,020	0,012	0,037
12	Mêmes rats, pommes de terre et glycobacter.	Février 1912.	250	1,030	0,15	0,033

VI. — **Urine des personnes au régime mixte.**

Influence du glycobacter peptolyticus.

Nos d'ordre.	ALIMENTATION et traitement.	DATE	QUANTITÉ d'urine en 24 h.	DENSITÉ à 15 degrés.	INDOXYLE par litre.	INDOXYLE en 24 h.
1	Mme C., régime mixte.	20 mars 1912.	1075	1.020	0.024	0,025
2	Même personne après 8 jours de traitement avec le glycobacter, puis avec des pommes de terre.	29 mars 1912.	650	1,025	0,010	0,006
3	Même personne trois semaines après la cessation du traitement.	18 avril 1912.	1350	1.017	0.011	0,015
4	Mme R., autre personne au régime mixte.	13 avril 1911.	700	»	0.025	0,020
5	Même personne au régime mixte.	27 févr. 1912.	900	1.018	0.055	0.039
6	Même personne après 8 jours de traitement avec le glycobacter puis avec des pommes de terre.	8 mars 1912.	1320	1.014	0.015	0,020
7	M. C., régime mixte.	20 janv. 1912.	1400	1.021	0.022	0,030
8	Même personne après traitement avec le glycobacter et pommes de terre.	30 janv. 1912.	1500	1.026	0,003	0,005
9	M. S., régime mixte.	3 févr. 1912.	950	1.020	0,026	0,025
10	Même personne après traitement avec le glycobacter et pommes de terre.	Février 1912.	975	1,015	0,006	»
11	Même personne plusieurs jours après la fin du traitement.	Février 1912.	900	1,020	0.011	0,001
12	Même personne avant la nouvelle période de traitement,	Mars 1912.	1100	1.028	0,027	0,030
13	Même personne à la fin d'une nouvelle période du traitement.	20 mars 1912.	1350	1,017	0,019	0,025

VII. — **Urine des 11 rats nourris aux quatre aliments.**

Nos d'ordre.	NOMS des aliments.	DATES	QUANTITÉ d'urine en c. c.	DENSITÉ à 15 degrés.	PHÉNOLS par litre.	INDOXYLE par litre.
1	Dattes 60 gr.; jambon 60 gr.; betteraves, 120 gr.; pommes de terre, 120 gr.	Du 20 au 28 mars 1912.	355	1,044	0,037	0,086
2	Même nourriture.	Du 19 avril au 27 avril 1912.	525	1,038	0,007	0,016
3	Même nourriture.	28 avril au 2 mars 1912.	400	1,034	0,011	0,006
4	Même nourriture, en plus bacilles bulgares et glycobacter.	3 au 7 mai 1912	410	1,034	0,005	Indosable.
5	Même régime avec bactéries.	8-11 mai 1912.	240	1,029	0,006	Indosable.
6	Idem.	12-20 mai 1912.	224	1,056	0,009	0
7	Seulement jambon et pommes de terre.	21-30 mai 1912.	400	1,046	0.021	Indosable.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XVIII

Fig. 1. — Matières fécales de rat nourri avec des œufs durs.

Fig. 2. — Matières fécales très alcalines d'un autre rat au même régime alimentaire.

Fig. 3. — Matières fécales faiblement acides d'un troisième rat nourri exclusivement avec des œufs durs.

Fig. 4. — Matières fécales de rat, nourri avec des dattes depuis deux mois.

Fig. 5. — Microbes des matières fécales d'un autre rat au même régime.

Fig. 6. — Contenu du cæcum de rat nourri aux carottes.

Fig. 7. — Matières fécales de rat nourri avec des dattes et des pommes de terre.

Fig. 8. — Matières fécales de rat nourri avec du jambon, des dattes, des pommes de terre et de la betterave.

SUR LE ROLE DES INFINIMENT PETITS CHIMIQUES EN AGRICULTURE (1)

par M. Gabriel BERTRAND.

Je me propose d'examiner, dans cette Conférence, une des questions nouvelles les plus intéressantes au point de vue théorique et pratique soulevée par l'étude de la composition chimique des espèces végétales : c'est la question du rôle joué par certains corps, métalloïdes et métaux, trouvés dans les plantes en très petites proportions.

Les premiers phytophysiologistes dont les recherches aient porté sur la composition élémentaire des végétaux n'ont pas tardé à tomber d'accord pour reconnaître qu'une dizaine environ de corps simples étaient nécessaires à l'édification des tissus et au fonctionnement des cellules : l'*hydrogène* et l'*oxygène*, dont l'association forme l'eau, soit les 75 à 95 centièmes du poids total des plantes vivantes ; le *carbone*, qui, lié aux deux précédents, constitue la cellulose, le sucre, les huiles et les autres substances dites hydrocarbonées; l'*azote*, qui entre avec les trois premiers dans la composition de l'albumine, du gluten et des matières protéiques, ainsi que le *soufre* et quelquefois le *phosphore*, enfin, le *potassium*, le *calcium*, le *magnésium* et de petites quantités de *fer*.

L'ensemble de ces dix éléments, de ces dix corps simples, est absolument nécessaire au développement normal des plantes. L'absence d'un seul entraîne la non-utilisation des autres et l'arrêt de la croissance.

Si l'on dispose convenablement, dans un vase rempli d'eau pure, une graine de haricot, de maïs, d'avoine, de sarrasin, etc., on assiste bientôt à la germination : une petite plante apparaît, se développe aux dépens de l'eau et des substances apportées par la graine, aux dépens aussi de l'acide carbonique contenu dans l'atmosphère, mais ce phénomène de végétation dure seulement quelques jours; faute d'autres aliments, la jeune plante ne tarde pas à mourir.

Au contraire, si on remplace l'eau pure par une solution renfer-

(1) Conférence faite au VIIIe Congrès international de chimie appliquée tenu à New-York au mois de septembre 1912.

mant, à l'état de sels, de l'azote, du soufre, du phosphore, du potassium, du calcium, du magnésium et un peu de fer, la plante se développe normalement, elle produit des fleurs et des graines et, lorsqu'on sait s'y prendre, la récolte ne le cède en rien à celles que l'on obtient en pleine terre, dans les conditions habituelles.

L'expérience recommencée encore, mais en supprimant de la solution nutritive un seul des éléments dont l'ensemble avait produit un si beau résultat, donne des récoltes misérables, analogues à celles de l'eau pure.

D'autre part, si on fait l'analyse complète d'un végétal et qu'on additionne les poids de chacun des éléments trouvés, on obtient, en ne tenant compte que de ceux énumérés plus haut, un chiffre voisin et même supérieur à 99,9 p. 100 du poids total.

De sorte que, à moins d'un millième près, les plantes sont constituées par la réunion de six métalloïdes et de quatre métaux et ces métalloïdes et ces métaux suffisent à former, par leurs multiples combinaisons, les énormes quantités de sucre, d'amidon, de cellulose, d'huile et autres substances, que l'industrie sépare ou transforme, et que l'homme et les animaux tirent du règne végétal pour les besoins de leur alimentation journalière.

Ces notions, malgré leur simplicité, sont fondamentales pour l'Agriculture. Il est bien évident, en effet, que l'on doit assurer à la plante la provision de chacun des éléments qui lui sont nécessaires si l'on veut obtenir de belles récoltes.

Comme dans les expériences de tout à l'heure, il n'y a pas, en grande culture, à se préoccuper du carbone, que la plante trouve toujours dans l'atmosphère en quantité supérieure à tous ses besoins. Pourvu que le sol reçoive une proportion d'eau suffisante, sous forme de pluie ou par irrigation, il reste seulement à compter avec les autres éléments. Encore, dans la plupart des cas, la terre est-elle si riche en composés du calcium, du magnésium, du fer, du soufre, que l'agriculteur n'a plus à subvenir qu'au manque de potassium, d'azote et de phosphore. C'est ce qu'il fait à l'aide des engrais. En ajoutant des quantités convenables de nitrates, de phosphates, de sels ammoniacaux et potassiques, il complète l'approvisionnement alimentaire du sol et permet à la plante de prélever en proportions utiles tous les matériaux de sa construction.

Ce sont surtout les recherches de Duhamel, de de Saussure, de Sachs, de Boussingault, de Liebig, de Georges Ville, qui nous ont fait connaître cette théorie des engrais dont la grande valeur pratique est confirmée aujourd'hui par tous les agronomes.

Aussi évidente et aussi féconde qu'elle soit, cette théorie ne tient

pas compte, principalement dans son application usuelle, de tous les résultats obtenus dans l'étude de la composition des végétaux ; elle néglige ceux qui, ajoutés aux 99,9 p. 100 d'éléments déjà considérés, permettraient d'atteindre le total de 100 p. 100 d'une analyse parfaite.

De quels corps est formée cette minime fraction qu'il nous faut maintenant examiner? Tout d'abord, comme on l'a très souvent vérifié, de *silicium*, de *chlore*, de *sodium*, de *manganèse* et d'*aluminium*. C'est vous dire qu'il n'y a dans les plantes que très peu de chacun de ces corps simples, souvent moins de 1/10.000 et même de 1/100.000. Les végétaux qui croissent au bord de la mer et à plus forte raison, dans celle-ci, comme les Fucus et d'autres Algues, renferment beaucoup plus de chlore et de sodium que les autres ; les Graminées, les Cypéracées, les Equisétacées sont relativement riches en silicium ; on peut aussi trouver des espèces contenant plus que des traces de manganèse ou d'aluminium. Mais ce sont là des exceptions qui n'empêchent pas de considérer comme très général le fait que les plantes contiennent seulement des proportions très petites de chacun des cinq nouveaux éléments dont je viens de vous donner les noms.

Le silicium, le chlore, le sodium, le manganèse et l'aluminium sont en si petites proportions qu'il a été très difficile jusqu'ici de se former une opinion quant à leur valeur nutritive. La plupart des phytophysiologistes doutent de leur rôle, certains le nient d'une manière formelle. Ils supposent, pour expliquer la présence de ces éléments chez les plantes, que les racines sont capables d'absorber indifféremment toutes les substances solubles contenues dans les milieux où elles se développent.

Arrivée déjà au nombre de 15, la liste des métalloïdes et des métaux rencontrés chez les plantes est-elle complète? Loin de là, elle ne représente que la moitié environ de tous les corps simples que les méthodes d'analyse, chaque jour plus perfectionnées, ont fini par porter à notre connaissance : l'*iode* et le *brome*, reconnus d'abord dans les plantes marines, mais dont il y a aussi, d'après Chatin et surtout Bourcet, des traces dans toutes les autres; le *fluor*, que Salm Horstmar a signalé dans l'orge et dans le pois; l'*arsenic*, trouvé récemment dans quelques Algues marines par Tassilly et Leroide : le *bore*, reconnu notamment dans le vin où on le croyait alors d'origine frauduleuse. Et parmi les métaux, le *rubidium* et le *cæsium*, signalés par Grandeau dans la Betterave ; le *lithium*, découvert par Bunzen et Kirchoff dans plusieurs végétaux des environs de Heidelberg; le *strontium*, rencontré par Forchammer dans le *Fucus vesicu-*

losus; le *baryum*, mis en évidence par Scheele dans les cendres de divers arbres et arbrisseaux, aussitôt après sa découverte dans la magnésie noire ; le *zinc*, que l'on a d'abord trouvé dans les plantes des terrains calaminaires ; le *cuivre*, fréquemment reconnu par Vauquelin, Sarzeau, Guérithault et d'autres encore; le *cobalt*, trouvé dans la Zostère marine, et même l'*argent*, dans le Fucus, d'après Malaguti, Durocher et Sarzeau ; enfin, le *vanadium* et le *cérium*, signalés, il y a peu d'années, par Demarçay.

C'est-à-dire qu'aux 15 éléments déjà énumérés, il faut en ajouter encore 18, ce qui nous donne une liste de 31 éléments sur les quatre-vingts et quelques actuellement connus.

Ce résultat général de l'analyse chimique des végétaux est vraiment digne de fixer l'attention. S'il est exact, en effet, que tous ou presque tous les éléments découverts dans les plantes entrent dans la constitution de leurs tissus ou interviennent dans leurs échanges nutritifs, il faut admettre que les végétaux possèdent une composition beaucoup plus complexe qu'on pouvait d'abord l'imaginer. Or, plus cette composition est complexe, plus augmente l'épaisseur du voile qui nous cache l'origine du monde végétal, plus deviennent nombreuses les difficultés qui entourent la solution d'une foule de problèmes relatifs à la physiologie des plantes.

Mais procédons systématiquement et n'anticipons pas trop vite sur les faits. Voyons, avant d'aller plus loin, si des éléments comme l'aluminium, le manganèse, le zinc, le bore, le silicium, etc., dont la proportion est si petite qu'elle a passé longtemps inaperçue, peuvent être des éléments physiologiques, c'est-à-dire nécessaires à la croissance de la plante, et non pas, comme on l'a soutenu, des corps étrangers, introduits par un simple phénomène d'osmose à travers les racines.

Pour cela, prenons comme exemple le cas du manganèse, le mieux étudié et le plus démonstratif.

Le manganèse paraît exister chez tous les végétaux. Observé déjà par Scheele dans les cendres du cumin sauvage et dans celles du bois, il a été reconnu ou dosé depuis dans une foule de graines, de racines, de feuilles ou de plantes entières. Sa proportion varie beaucoup suivant les espèces et suivant les organes ; elle est, en tous cas, fort petite, souvent inférieure au 1/100.000 et même au 1/1.000.000. C'est donc bien un élément qui, s'il est nécessaire au fonctionnement physiologique de la plante, peut être considéré comme le type de ceux dont nous recherchons la valeur.

Très frappé par la présence du manganèse dans les plantes, Sachs avait essayé, vers 1860, à l'aide de la méthode de culture en solutions salines, si ce métal était de quelque utilité pour les plantes supé-

rieures; il n'avait pu l'établir. Plus tard, en 1870, Raulin avait examiné la même question à propos d'une moisissure aujourd'hui bien connue des physiologistes, l'*Aspergillus niger*; il n'avait pas été plus heureux.

Ces insuccès, obtenus par deux expérimentateurs très habiles, ne suffisent pas à faire rejeter d'une manière définitive la valeur fonctionnelle du manganèse.

Presque tous les sels, même les plus purs fournis par le commerce, renferment des traces de manganèse. Il en résulte que Sachs et Raulin introduisaient, sans le savoir, du manganèse dans tous leurs milieux de culture.

D'autre part, comme toutes les plantes, si elles utilisent ce métal, ne le font qu'à l'état de traces, il est possible qu'elles en aient trouvé assez dans les milieux témoins, préparés par Sachs et par Raulin, pour qu'une addition volontaire soit alors restée sans effet appréciable.

Ainsi, la méthode des cultures s'est montrée tout aussi impuissante que la méthode chimique à nous faire savoir si le manganèse est de quelque utilité pour la plante.

Heureusement, une série de recherches, n'ayant d'ailleurs à l'origine, aucun rapport avec la question qui nous occupe, est venue apporter à celle-ci un argument décisif.

Tout le monde connaît les admirables bibelots de laque dus à la patience et au talent des artistes japonais. Ces bibelots, comme le magnifique vernis utilisé presque partout en Extrême-Orient pour recouvrir de petits meubles et de menus objets, sont préparés avec une sorte de lait d'origine végétale. Ce lait, ou latex, s'écoule lorsqu'on pratique des incisions à travers l'écorce de différentes espèces d'arbres appartenant au genre *Rhus* : *R. vernicifera* L. et *R. succedanea* L. Il est d'un blanc un peu jaunâtre et possède la propriété curieuse de se colorer au contact de l'air en brun, puis en noir d'ébène; en même temps, il se transforme en une substance très résistante aux réactifs et susceptible d'un beau poli.

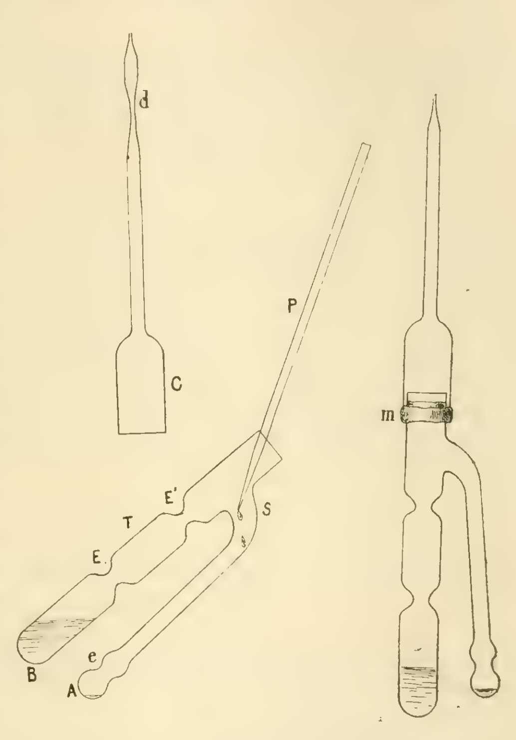
Ce phénomène est dû à l'oxydation du latex sous l'influence d'un principe spécial, assez facile à extraire, que j'ai étudié sous le nom de *laccase*.

Or, la laccase n'est pas seulement présente dane le latex des arbres à laque, elle est pour ainsi dire universellement répandue chez les végétaux, où elle joue le rôle capital d'intermédiaire entre l'oxygène contenu dans l'atmosphère, et diverses substances organiques, renfermées dans les cellules.

Je vais vous montrer, par quelques expériences, d'abord le pouvoir

oxydant de la laccase, puis l'existence de ce réactif biologique dans les plantes.

Chacun des petits appareils que voici est essentiellement constitué par deux tubes de verre soudés l'un à l'autre. Dans le plus petit (A) on met quelques gouttes de solution de laccase, dans le grand (B) un certain volume de solution ou d'émulsion du corps à oxyder. L'appareil étant garni, on y fait le vide avec une trompe à mercure, de façon à n'y laisser aucune trace d'air, puis on le ferme à la lampe.



Vient-on maintenant à retourner l'appareil, le contenu de chacun des tubes s'écoule et se mélange à l'autre; mais, comme il n'y a pas d'air il ne se produit aucune transformation chimique.

Dès, au contraire, qu'on laisse pénétrer l'air en brisant la pointe de l'appareil, la réaction commence et le corps oxydable se colore peu à peu. Si l'on a pris le laccol, retiré du latex de l'arbre à laque où il accompagne la laccase, il y a coloration brune, puis noire.

Avec le tanin des pommes, des marrons d'Inde, etc., la coloration est rouge-brun.

La résine de gayac devient d'un beau bleu, et ainsi de suite, selon la nature de la matière organique oxydable.

On peut, en se servant d'une solution alcoolique récente de résine de gayac, démontrer très facilement l'existence de la laccase dans les tissus végétaux, à condition que ceux-ci ne soient pas trop colorés.

Je verse quelques gouttes de solution de gayac sur la section d'une pomme de terre, d'un champignon de couche, d'une pomme : vous allez voir apparaître lentement, aux endroits où il y a de la laccase, une coloration bleue caractéristique.

Lorsque le tissu végétal est coloré, comme celui des feuilles, on

ne peut évidemment employer le procédé simple que je viens de vous montrer pour établir la présence de la laccase. Il faut recourir à la méthode générale, c'est-à-dire à l'extraction du principe oxydant que l'on essaye ensuite dans le tube à deux branches.

Voici maintenant comment la connaissance de la laccase et de son importance physiologique se rattache au sujet de notre conférence.

En poursuivant l'étude du principe oxydant de l'arbre à laque, j'ai trouvé que ce principe était dû à la combinaison d'une matière organique particulière, jouant le rôle d'un acide très faible, avec une petite quantité de manganèse. La quantité de métal contenue dans une préparation de laccase retirée de l'arbre à laque du Tonkin (*Rhus succedanea* L.) était de 0,12 p. 100.

Cette petite quantité de manganèse est indispensable au fonctionnement chimique de la laccase. Si on la lui enlève, elle perd la propriété d'agir comme fixatrice d'oxygène.

Il faut d'ailleurs remarquer que tous les sels manganeux jouissent, à un degré plus ou moins grand, du caractère essentiel de la laccase. Le tableau n° 1 montre que, pour différents sels, la puissance oxydante augmente en sens inverse de la force de l'acide auquel le métal est combiné; plus l'acide est faible, plus l'oxydation est rapide. Ainsi comprend-on que la laccase soit parmi les combinaisons les plus actives.

Tableau n° 1.

Pouvoir oxydant de divers sels manganeux vis-à-vis de l'hydroquinone.

(Gabriel Bertrand).

En agitant pendant vingt heures, à la température de + 14-15 degrés, dans un ballon de 250 cent. cubes de capacité, une solution de :

Hydroquinone	1 gramme
Eau distillée	100 cent. cubes
Manganèse (sous forme de sel)	0 gr. 100

les volumes suivants d'oxygène ont été absorbés :

Avec l'azotate	1,4	cent. cubes.
— le sulfate	1,6	—
— le chlorure	1,8	—
— le formiate	7,4	—
— le benzoate	15,3	—
— l'acétate	15,7	—
— le salicylate	16,3	—
— le lactate	17,6	—
— le gluconate	21,6	—
— le succinate	22,1	—

Il est facile d'imaginer par quelle série de réactions une quantité indéfinie d'oxygène est fixée sous l'influence de la laccase ou d'un sel quelconque de manganèse.

La combinaison manganeuse, que nous pouvons représenter schématiquement par la formule : RMn, est d'abord hydrolysée, du moins en partie, par l'eau dans laquelle elle est dissoute. Il en résulte un mélange d'acide libre et de protoxyde de manganèse :

(1) $$RMn + H^2O = RH^2 + MnO.$$

Le protoxyde de manganèse est une combinaison très oxydable. Au contact de l'air, il se transforme en bioxyde. Cette propriété est même la base du procédé Weldon pour la régénération industrielle du bioxyde servant à préparer le chlore. Pendant cette oxydation :

(2) $$MnO + O^2 = MnO^2 + O.$$

la molécule d'oxygène O^2 est fatalement scindée en deux atomes, atomes non saturés et, par conséquent, plus actifs ; l'un d'eux se porte sur la molécule de protoxyde de manganèse, tandis que l'autre peut se fixer, soit sur une seconde molécule de MnO, soit sur un autre corps oxydable, comme celui du latex de l'arbre à laque, ou bien encore la résine de gayac, l'hydroquinone, etc., qui seuls résisteraient au contact de l'oxygène moléculaire.

Cette phase réactionnelle étant accomplie, on se trouve en présence d'acide libre, de bioxyde de manganèse et de l'excès de corps oxydable.

Grâce à ce dernier, dont la chaleur d'oxydation s'ajoute à celle de formation du sel manganeux, il y a réaction entre l'acide et le bioxyde :

(3) $$RH^2 + MnO^2 = RMn + H^2O + O.$$

L'atome d'oxygène libéré se fixe sur une nouvelle molécule du corps oxydable *et la combinaison manganeuse primitive est régénérée.* Elle peut entrer à nouveau dans le cycle des réactions que je viens de décrire et, cela, un nombre de fois qui, théoriquement, est indéfini.

Il suit de là qu'un poids déterminé, même très petit, de composé manganeux peut oxyder, aux dépens de l'oxygène atmosphérique, un poids illimité de corps oxydable. L'exactitude de cette interprétation a d'ailleurs été démontrée par l'expérience.

Ainsi, d'une part, les végétaux qui ne peuvent se passer d'oxygène pour accomplir certaines transformations chimiques, utilisent la laccase comme intermédiaire dans ces transformations ; d'autre part, la laccase est une combinaison de manganèse. *Les végétaux ont donc besoin de manganèse.*

En outre, comme une quantité même très petite du métal suffit à fixer des quantités pour ainsi dire indéfinies d'oxygène, on peut admettre que *les végétaux n'ont besoin pour leur fonctionnement normal que d'une proportion très petite de manganèse.*

Il est possible de démontrer, d'une manière directe, l'exactitude de cette conclusion.

En se servant de sels purifiés par des méthodes spéciales, d'eau très pure et en opérant dans des vases en quartz fondu, on prépare une solution nutritive pour ainsi dire rigoureusement exempte de manganèse.

Si l'on introduit alors dans cette solution des semences de la petit plante dont je vous ai parlé tout à l'heure, de l'*Aspergillus niger*, il y a germination et développement, mais on n'obtient qu'une très mince récolte. Par exemple, si on opère avec un quart de litre, environ 2 gr. 80. Mais si on recommence la culture en ajoutant à la solution nutritive 0 gr. 000.0025 de manganèse, la plante croît d'une manière si vigoureuse qu'elle atteint aisément le poids de 11 gr. 75. Une quantité 10 fois et même 100 fois plus petite de manganèse donne encore une augmentation de récolte très appréciable en suivant cette technique perfectionnée.

Voilà donc établie, par des voies différentes, l'utilité pour le végétal d'un de ces éléments dont la proportion est si petite qu'ils pouvaient nous sembler tout d'abord accidentels et sans aucune valeur physiologique.

L'état de nos connaissances n'est pas aussi avancé en ce qui concerne les métalloïdes et les métaux qui, toujours en très petites proportions, accompagnent le manganèse. Nous n'avons guère de notions un peu étendues et bien solides que pour le zinc et le bore.

Comme vous le savez, Raulin avait découvert, en poursuivant des recherches devenues classiques, qu'une minime proportion de zinc, environ 1/100.000 du milieu de culture, était nécessaire pour obtenir de belles récoltes d'*Aspergillus*. On avait, dans la suite, expliqué ce résultat en admettant que le sel de zinc agissait d'une façon indirecte, en détruisant les microbes qui auraient pu envahir le milieu et nuire au développement de la plante.

Un de mes collaborateurs, Javillier, a donné la preuve que cette interprétation est erronée, que le zinc fait partie de la composition de l'*Aspergillus* et agit sur sa croissance, à la façon du manganèse. Il a montré, de plus, que le zinc se rencontre parmi les éléments habituels des végétaux et il a pu le doser dans un grand nombre d'espèces très différentes.

Un autre de mes collaborateurs, Agulhon, s'est livré à une enquête analogue au sujet du bore. Il a réussi à reconnaître et même à doser ce métalloïde dans toutes les plantes qu'il a examinées.

D'autres recherches sont en cours; elles permettront de distinguer peu à peu les éléments dont l'existence est normale, de connaître ensuite la part prise par chacun d'eux dans les phénomènes nutritifs de la plante. Il faudra, cela est certain, beaucoup de travail et de temps pour remplir ce programme, mais, déjà, nous pouvons considérer comme résolue la question fondamentale qui est le nœud même de cette Conférence, à savoir que *des métalloïdes et des métaux, présents dans le corps de la plante en proportions infimes, peuvent cependant être des éléments physiologiques, aussi nécessaires au métabolisme général que le carbone et l'azote.*

Ces métalloïdes et ces métaux, trop peu abondants pour entrer dans la composition des appareils de soutien ou des substances de réserve, ne peuvent avoir, comme le manganèse, qu'un rôle d'intermédiaire, de catalyseur, dans les réactions chimiques. Il faut qu'ils entrent dans les cycles de transformations mis en jeu par la culture pour l'organisation des éléments plastiques, et en sortent alternativement. Leur rôle est, jusqu'à un certain point, comparable à celui des ferments et on peut les appeler, autant pour faire image que par commodité, des infiniment petits chimiques.

Il reste à envisager les conséquences qui se dégagent de l'importante conclusion à laquelle nous venons d'arriver. Limité par le temps, guidé par la nature de notre Congrès, je m'attacherai seulement ici à l'une d'elles : c'est l'application à l'Agriculture du manganèse, du bore et d'autres infiniment petits chimiques.

J'ai déjà parlé de cette application au VI[e] Congrès international de Chimie, tenu à Berlin en 1903. A cette époque, la question était tout à fait dans l'enfance; depuis, elle a grandi quelque peu, des expériences nombreuses ont été faites, en différents pays, par beaucoup de savants et d'agronomes. La comparaison des résultats obtenus est intéressante, et l'on peut sérieusement prétendre qu'en bien des cas l'adjonction du manganèse, du bore et d'autres engrais, dits *catalytiques*, aux engrais ordinaires est d'une grande importance économique.

On n'a pas manqué, au début, d'objecter contre l'emploi agricole du manganèse que la terre renfermait habituellement des quantités si grandes du métal qu'une faible addition devait rester sans effet.

A cette objection, je puis répondre tout d'abord que la quantité totale de manganèse trouvée dans le sol ne doit pas entrer seule en

ligne de compte. Une grande partie, sinon la totalité, du métal peut exister sous des formes : silicates, sesquioxyde, etc., difficilement solubles et, par conséquent, peu assimilables. L'adjonction d'un faible poids de sulfate ou même de carbonate de manganèse suffit alors à augmenter, dans une proportion relativement considérable, le stock de métal soluble nécessaire au développement de la plante.

Ensuite, comme le montre l'expérience du tableau n° 2, la plante n'utilise pas la totalité du manganèse disponible.

Elle en absorbe seulement une certaine proportion et cette proportion est d'autant moins grande que le stock est plus élevé. Il est donc bon de lui en offrir, jusqu'à une certaine limite pratique, beaucoup plus qu'elle n'en peut prendre.

TABLEAU N° 2.

Influence du manganèse sur la culture de l'*Aspergillus niger*.

(Gabriel BERTRAND et JAVILLIER.

Cultures en matras, de 2 litres.
Volume du liquide nutritif : 250 cent. cubes.
Température : + 32 degrés.
Durée : 4 jours.

QUANTITÉS de manganèse introduites.	DILUTIONS du manganèse.	POIDS secs des récoltes.	QUANTITÉS de manganèse fixées.
0 (témoin)	—	1 gr. 331	0 mgr. 001
0 mgr. 5	1/500.000	1 gr. 490	0 mgr. 030
1 mgr. »	1/250.000	1 gr. 635	0 mgr. 036
2 mgr. 5	1/100.000	1 gr. 700	0 mgr. 056
10 mgr. »	1/25.000	2 gr. 190	0 mgr. 106
25 mgr. »	1/10.000	2 gr. 380	0 mgr. 190
100 mgr. »	1/2.500	2 gr. 700	0 mgr. 700
500 mgr. »	1/500	2 gr. 765	4 mgr. 000
1250 mgr. »	1/200	3 gr. 510	10 mgr. 000
2500 mgr. »	1/100	3 gr. 390	22 mgr. 000

L'expérience agricole est pleinement d'accord avec cette manière de voir. Il ne m'est pas possible, comme vous le comprenez, de vous donner un compte rendu détaillé des expériences extrêmement nombreuses que j'ai faites ou qui sont parvenues à ma connaissance depuis plus d'une dizaine d'années. La suivante, consignée dans le tableau n° 3, est parmi les plus typiques. Elle a été répétée à plusieurs reprises avec le même succès et elle vous donnera une très bonne idée de ce que l'on peut obtenir en opérant dans des conditions précises.

Tableau n° 3.

Influence du manganèse sur la culture de l'avoine.

(Gabriel Bertrand et Thomassin).

Surface de chaque parcelle : 2.000 mètres carrés.

Nature du sol : argileux, très faiblement calcaire. Contient 0.024 p. 100 de manganèse soluble dans l'acide acétique bouillant au centième et 0.033 p. 100 de manganèse soluble seulement dans l'acide chlorhydrique concentré chaud.

Engrais ajoutés par hectare : 1° à chaque parcelle, 200 kilogrammes de superphosphate minéral à 15 p. 100 environ de P^2O^5 et 75 kilogrammes de sulfate d'ammoniaque à 20.5 p. 100 d'azote ; 2° à la parcelle en expérience, 50 kilogrammes de sulfate de manganèse à 31.58 p. 100 de Mn.

	SANS MANGANÈSE	AVEC MANGANÈSE
Poids total de la récolte	1.290 kil.	1.580 kil.
— à l'hectare	6.450 —	7.900 —
Poids après battage :		
Poids du grain	518 kil.	608 kil.
— — à l'hectare	2.590 —	3.040 —
— de la paille et des balles	768 —	968 —
— — à l'hectare	3.840 —	4.840 —
Analyse du grain :		
Poids de l'hectolitre	44 kil.	46 kil.
Eau à + 110 degrés	17,48 p. 100	16,85 p. 100
Cendres	2,82 —	2,88 —
Manganèse	0,004 p. 100	0,004 p. 100
Azote total	1,61 p. 100	1,58 p. 100

Différence en faveur du manganèse :

Pour l'ensemble de la récolte	22,5 p. 100
Soit pour le grain	17,4 —
— — la paille	26,0 —

En comparant les chiffres placés sous vos yeux, vous voyez qu'une addition de sulfate de manganèse correspondant à 15 kilogrammes environ de métal par hectare a fourni une augmentation de 450 kilogrammes de grains et de 1.000 kilogrammes de paille, sans compter un poids notable de racines qui est resté dans le sol et s'y est transformé plus tard en humus.

Ce résultat n'est pas le moins bon, mais il n'est pas non plus le meilleur. A côté d'autres très faibles ou même nuls, on a signalé des augmentations de récolte s'élevant jusqu'à 40 p. 100. De telles variations dépendent, comme dans le cas des engrais ordinaires, des espèces végétales cultivées et surtout de la nature du sol. Je ne puis entrer ici dans le détail, mais, en résumant, je vous dirai que l'on a

obtenu des résultats favorables dans les deux tiers environ des expériences entreprises avec différents sols et différentes plantes.

On n'a pas seulement appliqué le manganèse comme engrais catalytique. Dans mon laboratoire, Javillier, Agulhon, dont je vous ai déjà cité les recherches, ont étudié au même point de vue le zinc et le bore. En Bohême, Stoklasa a essayé l'aluminium ; au Japon, Loew et ses élèves : Aso, Nagaoka, Sawa, Katayama, en France, Boullanger, ont même fait des expériences avec le fluor, le baryum, le cérium, etc. De la série de ces expériences, il semble résulter que le bore et, peut-être, l'aluminium puissent se ranger pratiquement à côté du manganèse.

Voici, tirée parmi beaucoup d'autres, une expérience d'Agulhon avec le bore et le maïs (tableau n° 4).

Tableau n° 4.

Influence du bore sur la culture du maïs.

(Agulhon.)

Surface de chaque parcelle : $2^{m^2}5$.
Nature du sol : terre de jardin en jachère depuis plusieurs années.
Nombre des pieds par parcelle : 24.
Engrais ajoutés : à la parcelle n° 1, rien ; à la parcelle n° 2, 28 kilogrammes d'acide borique, soit 5 kilogrammes de bore par hectare ; à la parcelle n° 3, 36 kilogrammes d'acide borique, soit 10 kilogrammes de bore par hectare.
Récolte en fourrage après sept semaines :

	PARCELLE N° 1	PARCELLE N° 2	PARCELLE N° 3
	—	—	—
Poids frais.	3 kil. 835 gr.	6 kil. 985 gr.	6 kil. 190 gr.
Augmentations de poids frais.	»	56 p. 100	61 p. 100
Poids secs.	445 »	670 »	620 »
Augmentations de poids secs.	»	50 p. 100	39 p. 100
Composition :			
Eau.	88,2 p. 100	88,9 p. 100	90,0 p. 100
Matières sèches.	11,8 —	11,1 —	10,0 —
Cendres p. 100 de matières sèches.	13,6 —	13,0 —	15,7 —
Bore p. 100 de cendres. .	0,0241	0,0241	0,0274
— — de matières sèches.	0,0033	0,0032	0,0042

ainsi qu'une des expériences de Stoklasa avec l'aluminium et la betterave (tableau n° 5).

TABLEAU N° 5.

Influence de l'aluminium sur la culture de la betterave.

(STOKLASA.)

Surface de chaque parcelle : 5.000 mètres carrés.

Engrais ajoutés par hectare : 1° à chaque parcelle, 50 kilogrammes de P^2O^5, à l'état de superphosphate ; 60 kilogrammes d'azote, à l'état de nitrate de sodium ; 80 kilogrammes de K^2O, à l'état de chlorure de potassium ; 2° en outre, aux parcelles en expériences, 9 kilogrammes d'aluminium, à l'état de sulfate.

Poids d'aluminium introduit à l'hectare.	»	9 kil.
Poids des racines à l'hectare.	35.800 kil.	36.100 —
Augmentation à l'hectare.	»	300 —
Poids des feuilles à l'hectare.	27.400 —	27.500 —
Sucre p. 100 de racines.	17,3 p. 100	17,5 p. 100
Sucre total à l'hectare.	6.193 kil.	6.317 kil.
Augmentation de sucre à l'hectare. . .	»	124 —
Augmentation de sucre p. 100 de témoin.	»	2,0 p. 100
Poids d'aluminium introduit à l'hectare.	»	9 kil.
Poids des racines à l'hectare.	36.200 kil.	38.000 —
Augmentation des racines à l'hectare. .	»	1.800 —
Poids des feuilles à l'hectare.	18.400 —	20.800 —
Sucre p. 100 de racines.	16,5 p. 100	16,7 p. 100
Sucre total à l'hectare.	5.973 kil.	6.346 kil.
Augmentation de sucre à l'hectare. . .	»	373 —
Augmentation de sucre p. 100 de témoin.	»	6,2 p. 100

Il ne faut pas oublier, lorsqu'on expérimente avec les engrais catalytiques, d'opérer avec un peu de prudence, car ils ont une grande activité physiologique. Si on en ajoute trop, non seulement on fait une dépense inutile, mais on peut obtenir, comme cela s'est vu plusieurs fois, de mauvais résultats. Un tel effet, déjà très sensible avec le bore, peut même devenir rapidement dangereux avec le zinc. Il varie d'ailleurs beaucoup avec les espèces végétales et l'on peut voir, dans un même sol, le maïs résister beaucoup mieux que l'avoine à l'élévation de dose de l'acide borique.

La connaissance du rôle des infiniment petits chimiques, même envisagée au seul point de vue agricole, touche à plusieurs problèmes. Elle touche tout d'abord, comme vous le comprenez, à celui des causes de la fertilité des sols. Pour apprécier la valeur de ceux-ci, il ne suffira plus, comme on le faisait jusqu'à présent, de tenir compte de leur richesse en azote, en phosphore et en potassium ; il va falloir se préoccuper aussi des autres métalloïdes et des autres métaux qu'ils

renferment et nous allons être conduits à l'adoption de méthodes d'analyse dont nous n'avons pas encore l'habitude.

La connaissance du rôle des infiniment petits chimiques nous apporte un nouvel argument explicatif de la nécessité des rotations culturales. Lorsque certaines plantes sont maintenues sans discontinuité sur le même sol, il arrive souvent que le poids des récoltes diminue très vite avec les années pour devenir parfois presque nul, et, cela, malgré des additions régulières de fumier et d'engrais chimiques destinés à compenser les pertes d'humus, d'azote, de potassium et de phosphore. Au contraire, si on établit des rotations, c'est-à-dire si on fait alterner la culture de ces plantes avec celle d'espèces végétales très différentes, par exemple la betterave avec l'avoine et la luzerne, on obtient chaque fois des récoltes normales.

La tendance est très forte aujourd'hui d'expliquer ce phénomène par un empoisonnement du sol par les racines. Selon cette explication, chaque espèce produirait une substance toxique particulière, comparable à l'urine et aux gaz de la respiration humaine, dans laquelle elle ne pourrait plus continuer à vivre. Cette substance, non toxique pour une autre espèce, disparaîtrait, par oxydation ou autrement, dans l'intervalle de la rotation.

N'est-il pas au moins aussi probable qu'une plante peut cesser de croître dans un sol lorsqu'elle a abaissé au-dessous d'une certaine proportion la partie assimilable d'un élément catalytique dont elle a un besoin particulier ? En admettant cette explication, il resterait encore assez de l'élément considéré sous la forme assimilable pour une autre espèce moins exigeante et la provision primitive pourrait alors se renouveler pendant la rotation, grâce aux influences atmosphériques et aux actions microbiennes.

L'examen comparé de ces théories n'a pas seulement un intérêt spéculatif ; il a aussi une conséquence pratique. En effet, si la seconde théorie est la bonne, il devra suffire de déterminer la nature et la proportion de l'élément ou des éléments catalytiques spéciaux à chaque culture, puis d'en ajouter au sol une quantité convenable pour rendre à celui-ci toute sa fertilité et se délivrer, si on y trouve profit, de la nécessité des rotations culturales.

Il est intéressant de remarquer que, lorsqu'on ajoute une substance fertilisante au sol, on n'agit pas uniquement sur la plante dont on veut augmenter la récolte. On modifie encore, dans un sens ou dans l'autre, la nutrition des bactéries, des champignons et de tous les êtres microscopiques qui vivent dans le sol. Il n'est pas impossible qu'en ajoutant du manganèse, par exemple, on favorise sélectivement certains microbes oxydants capables de former des nitrates ou de

détruire les produits toxiques, comme ceux dont je vous parlais tout à l'heure.

Il faut sans doute rechercher dans la richesse relative des sols en certains éléments catalytiques les causes parfois si obscures de l'adaptation des espèces végétales, les raisons de la facilité plus ou moins grande que possèdent les sols de nourrir telle plante et non pas telle autre.

Enfin, la notion des infiniment petits chimiques peut être introduite jusque dans l'étude de la Pathologie végétale. L'*Aspergillus niger* et les moisissures en général utilisent des doses de zinc beaucoup plus élevées que les plantes supérieures. Or, il a paru, dans les recherches de Javillier, que le froment, cultivé dans des milieux additionnés de zinc, était plus facilement atteint par l'*Erysiphe graminis* que la même plante venue dans le milieu témoin, où il ne pouvait y avoir que des traces du métal.

Ainsi, qu'il s'agisse de parasitisme ou d'occupation du sol, le conflit des espèces reste sous la dépendance de la composition chimique du milieu. Et notre esprit entrevoit comment des variations dans le rapport de certains éléments, dont la présence exige les méthodes les plus délicates de la physique et de la chimie pour être démontrée, peuvent entraîner, selon les cas, la prospérité ou la maladie et la mort.

L'Agriculture est certainement la branche de l'activité humaine qui augmente le plus le capital d'énergie mondiale. En s'efforçant d'obtenir des récoltes abondantes de céréales, de textiles, de sucre, de fourrages, etc., elle favorise la captation d'une énergie étrangère au globe terrestre et qui ne coûte rien, l'énergie solaire, origine de toutes les formes d'énergie utilisées par l'homme.

Perfectionner l'Agriculture, forcer le sol au maximum de rendement, c'est donc abaisser le prix des aliments, augmenter les forces humaines, faciliter l'asservissement de la matière et la libération de l'intelligence.

Dans un pays où cette grande question a été si bien comprise, il m'était particulièrement agréable d'évoquer, à l'occasion du Congrès qui vient de s'ouvrir, une application de la Chimie biologique à l'Agriculture. Je serais heureux si la notion des infiniment petits chimiques chez les plantes, que je viens de vous présenter, pouvait aider l'Agriculture à réaliser de nouveaux progrès.

LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX
ET
LES TUBERCULOSES DITES ATTÉNUÉES

par Et. BURNET

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les recherches récentes sur l'épidémiologie de la tuberculose, chez les peuples les plus divers et dans les conditions les plus variées, ont abouti à cette notion qu'il n'existe pas d'immunité naturelle à la tuberculose et que les exemples de résistance si souvent observés sont des faits d'immunité acquise. Le contraste entre l'extrême sensibilité des peuples primitifs, qui offrent au microbe un terrain vierge, et la mortalité relativement faible des peuples européens, profondément imprégnés par le virus, a imposé l'idée que l'immunité soi-disant naturelle d'un certain nombre de civilisés repose sur une vaccination inconsciente, et que si l'homme peut contracter pendant l'enfance le germe d'une tuberculose fatale, il peut aussi surmonter une infection bénigne qui le laisse vacciné (1).

Il faut donc qu'il existe des microbes capables de jouer le rôle de vaccins, et il est tout indiqué de les chercher dans la nature, avant d'essayer de les fabriquer ou de les perfectionner dans le laboratoire. Logiquement, les premières investigations doivent porter sur les tuberculoses que l'on considère comme bénignes, que l'on appelle couramment des *tuberculoses atténuées*, et que l'on réunit souvent sous le nom

(1) J'adresse mes remerciements aux chefs de services des hôpitaux, qui ont pris intérêt à ces recherches, et ont bien voulu mettre à ma disposition le matériel nécessaire : à l'hôpital des Enfants-Malades, M. le professeur Hutinel, M. le Prof. agrégé Nobécourt et M. Tixier; M. le professeur Kirmisson et M. Bailleul; MM. le professeur agrégé Broca et le Dr Trèves; M. le professeur agrégé Terrien et M. Hillion; à l'hôpital Saint-Louis, MM. le Dr Thibierge et le Dr Ravaut; MM. le Dr Darier et le Dr Civatte; à l'hôpital maritime de Berck-sur-Mer, M. le Dr Ménard, ses assistants MM. Andrieu et Calvé et le Dr Denet.

encore vague de scrofuloses. Telle était la conclusion de l'étude sur l'épidémiologie de la tuberculose dans les steppes des Kalmouks, publiée l'an dernier par Metchnikoff, Burnet et Tarassévitch : « Il doit être très utile d'étudier le virus ou, probablement, les virus scrofuleux, parmi lesquels on trouverait peut-être le vaccin que l'on cherche avec tant de zèle depuis la grande découverte de Koch (1). »

Scrofulose est-il un terme synonyme de tuberculose atténuée? ou doit-il désigner, en plus, d'autres états infectieux non tuberculeux? Il y a là à la fois une question de mots et une question de choses. A mesure que l'on a mieux connu la tuberculose et les moyens d'isoler et de cultiver le bacille tuberculeux, la plupart des maladies que l'ancienne médecine appelait scrofuleuses ont pris leur place dans le cadre de la tuberculose; il en sera sans doute de même des affections scrofuleuses dont la nature est encore contestée, — par exemple, la conjonctivite phlycténulaire des enfants, — ou bien on en déterminera la cause propre. Le terrain scrofuleux est-il autre chose qu'un organisme touché d'une certaine manière par la tuberculose? c'est une question que nous ne sommes pas encore en état de trancher. En attendant, on ne soulève aucun problème et l'on se fait parfaitement comprendre en appelant scrofuloses des tuberculoses lentes, torpides, d'allure bénigne, auxquelles les médecins attribuent depuis longtemps le pouvoir de créer une certaine protection contre la phtisie tuberculeuse.

Bazin considérait la tuberculose pulmonaire comme relativement bénigne chez les scrofuleux. Lasègue a exprimé la même opinion. Cordier, médecin lyonnais, disait que la tuberculose, comme la syphilis, n'est pas réinoculable au porteur, et Cornil, que les inoculations de lupus serviraient peut-être un jour de vaccination contre la tuberculose. On se rappelle les conclusions cliniques du mémoire bien connu de Marfan (2) : les lupiques et écrouelleux complètement guéris ne font jamais de tuberculose pulmonaire; les lupiques et écrouelleux non guéris en font rarement; les phtisiques qui n'ont jamais eu de lupus ni d'écrouelles sont beaucoup plus nombreux que ceux qui en ont; enfin, les phtisiques porteurs de cicatrices

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, novembre 1911.
(2) *Archives gén. de Médecine*, t. I, p. 423, 1886.

de lupus ou d'écrouelles parfaitement guéries sont une rareté.

La première question qui se pose est de savoir si les bacilles isolés de tuberculoses bénignes sont des bacilles bénins; si aux tuberculoses atténuées des cliniciens correspondent, pour le bactériologiste, des bacilles atténués. On se demandera ensuite s'il est possible de trouver parmi ces bacilles, sinon d'emblée un vaccin tuberculeux, du moins des bacilles dont les propriétés rendent certaine l'idée de l'existence de vaccins naturels et de vaccination spontanée. Les bacilles atténués seraient comme la matière première des vaccins que l'on préparerait au laboratoire.

C'est la question de la virulence des bacilles tuberculeux. Il ne peut y avoir de vaccination spontanée que s'il existe dans la nature des bacilles tuberculeux de virulence inégale et si la qualité du virus joue un rôle important dans l'infection. Or, il est remarquable que tout en parlant couramment de tuberculoses atténuées l'on ait si peu étudié les bacilles tuberculeux au point de vue de leur qualité, et que l'on ait presque toujours expliqué l'allure des infections et des réinfections par la quantité des microbes qui pénètrent dans l'organisme.

J'ai étudié au point de vue de la qualité, c'est-à-dire de la virulence, 75 bacilles tuberculeux que j'ai isolés de tuberculoses articulaires et osseuses (26), de tuberculoses ganglionnaires (23), de tuberculoses cutanées (10), et de tuberculoses internes (poumon, rein, méninges) qui ont servi de termes de comparaison. Je n'ai trouvé sur ce nombre qu'un bacille réellement atténué. Cette rareté des bacilles faibles, loin d'être une preuve contre l'existence de bacilles-vaccins, montre la voie où les recherches doivent être poursuivies, toujours avec l'arrière-pensée de trouver une méthode d'immunisation artificielle qui ne serait que l'imitation de la vaccination spontanée.

I. — Origine.

Sur 59 bacilles isolés de tuberculoses externes, je n'en ai pas trouvé un seul du type bovin. L'aspect des cultures et surtout l'inoculation au lapin ont établi que tous sont du type humain. Il faut ajouter que tous les sujets sont des Parisiens,

Le fait est intéressant au point de vue de l'épidémiologie de

la tuberculose. A la suite des affirmations de R. Koch et de son école, que la tuberculose de l'homme vient avant tout de l'homme, on a fait un grand nombre de déterminations du type des bacilles, et il est bien établi aujourd'hui que la tuberculose pulmonaire est en somme toujours causée par le bacille humain : on ne connaît sur 790 cas, bien étudiés bactériologiquement, que 6 exceptions : 3 cas à bacille bovin, dont l'un n'est même pas certain, 2 cas mixtes où le bacille humain était allié au bacille bovin, et 1 cas où le bacille n'a pu être déterminé exactement (Kossel; Mohler et Washbourn). Dans les tuberculoses externes, la proportion des bacilles bovins est plus forte, ils ne sont même plus l'exception, surtout dans celles des enfants : la moyenne des examens faits par différents auteurs donne 36 p. 100 de bacilles bovins dans les ganglions du cou des sujets de cinq à seize ans, et 58 p. 100 chez les enfants au-dessous de cinq ans. Or, mes 23 tuberculoses ganglionnaires concernent 3 enfants au-dessous de cinq ans, 16 de cinq à seize ans, 2 de dix-sept à vingt et un ans, 3 adultes. Bien que le nombre des enfants soit un peu faible, le total est suffisant pour donner à penser que la fréquence de l'infection à bacille bovin varie d'une contrée à une autre et qu'elle paraît être beaucoup moindre à Paris qu'à Londres et à New-York. De plus, l'absence de bacille bovin dans 23 cas de tuberculose ganglionnaire et dans 26 cas de tuberculoses articulaires et osseuses (presque toutes infantiles) est un argument contre l'importance du lait comme agent d'infection, et pour la prédominance à peu près universelle de la contagion d'homme à homme.

Ces faits sont intéressants aussi au point de vue de la virulence des bacilles tuberculeux. Quoique le bacille bovin soit plus virulent que le bacille humain pour le lapin, le singe, le cobaye et les bovidés, on a pu penser qu'il l'est moins pour l'homme. On cite les curieuses expériences de Klemperer et les observations de Kleine sur la bénignité des tuberculoses cutanées des ouvriers de boucherie. On va même jusqu'à supposer que le bacille bovin pût être un vaccin pour l'homme, comme le bacille humain un vaccin pour le bœuf. Weber et Ungermann (1)

(1) *Tub. Arb. aus dem K. Gesundheitsamte*, f. 10, 1910, et f. 12, 1912.

ont réuni plusieurs centaines de cas où des enfants ont consommé cru du lait de vache bacillifère sans qu'il s'en soit suivi, après plusieurs années, aucune infection grave, alors que chez des veaux et des porcs l'ingestion du même lait a été meurtrière. Or, nos cas de tuberculose osseuse et ganglionnaire sont pour la plupart cliniquement bénins, ce qui prouve que le bacille humain se trouve souvent dans les tuberculoses atténuées. La commission anglaise a enregistré des cas (exceptionnels, il est vrai) de tuberculose pulmonaire mortelle à bacille bovin, ce qui prouve que le bacille bovin peut aussi être fatal pour l'homme. Mais s'il était établi que dans la grande majorité des cas la pénétration de bacilles bovins dans le tube digestif de l'homme et surtout de l'enfant est moins offensive que celle de bacilles humains, la conséquence serait qu'il faut aussi étudier les bacilles bovins au point de vue de la virulence et chercher s'il ne se trouve pas aussi parmi eux des bacilles-vaccins.

II. — Virulence.

Quoique l'idée de chercher des différences de virulence parmi les bacilles tuberculeux soit presque aussi ancienne que la découverte du bacille lui-même, elle a donné lieu à un très petit nombre de travaux; et certains ont manqué en partie leur but, soit parce qu'ils consistaient en inoculations de produits naturels, pus et tissus, dont la teneur en bacilles était inconnue, soit parce que les inoculations étaient faites sur le lapin, animal trop résistant à la tuberculose humaine : ce sont justement ces inoculations qui ont abouti au procédé de diagnostic entre bacilles humains et bacilles bovins par injection au lapin. Les expérimentateurs, tout en ayant conscience de la portée de leurs expériences, ne se proposaient pas délibérément la recherche de bacilles-vaccins, et ils ont enregistré plutôt des nuances que de profondes différences de virulence.

Dès 1887, Arloing (1) essaye de distinguer expérimentalement la scrofule de la tuberculose par des inoculations comparées de ce qu'il appelle des virus tuberculeux (de tuberculose des poumons et des séreuses) et des virus

(1) *Revue de Médecine*, t. I, 1887.

scrofuleux (prélevés dans les ganglions du cou chez des enfants ne donnant aucun signe de tuberculose viscérale).

Il constate que la tuberculose vraie se généralise chez le cobaye et le lapin, tandis que la scrofulose se généralise seulement chez le cobaye. Lorsqu'un virus de ganglion tuberculise le lapin, c'est que dans ce cas, pense Arloing, il y avait de la tuberculose vraie sous la scrofulose. Il croit voir qu'un virus de tuberculose osseuse devient plus pathogène pour le lapin après passages par cobayes, tandis que ces passages ne modifient pas un virus provenant d'un ganglion. « L'organisme du cobaye relève assez rapidement le virus affaibli des tuberculoses chirurgicales et ne semble pas exercer d'influence sur le virus de la scrofule ganglionnaire. Donc, si tant est que la scrofule dérive du bacille tuberculeux, les microbes qui la déterminent sont encore plus éloignés de leur virulence primitive que ceux qui engendrent les tuberculoses locales. Peut-être en sont-ils assez éloignés pour constituer une variété fixe, analogue à ces microorganismes qui après avoir vécu pendant plusieurs générations sur une espèce animale, sont devenus incapables de tuer l'espèce qui les avait fournis. »

Conclusion : il existe deux virus, ou deux espèces inégalement virulentes d'un même virus, et l'on peut différencier la tuberculose et la scrofule par inoculations comparées au lapin et au cobaye.

Nous savons aujourd'hui que le lapin inoculé avec une technique convenable ne prend de tuberculose généralisée qu'avec le bacille bovin et se prête mal à la comparaison des virulences de bacilles tuberculeux isolés chez l'homme, surtout quand on n'a pas déterminé leur type humain ou bovin. En outre, Arloing reconnaît que, s'il y a des adénites scrofuleuses, il y en a aussi de tuberculeuses. Enfin nous ne savons rien sur la teneur en bacilles des produits tuberculeux qu'il inoculait aux animaux. *Tout essai sur la virulence des bacilles tuberculeux doit être fait par inoculation de quantités définies, pesées, de cultures pures.*

Vagedes (1) a étudié 30 cultures pures, dont il inoculait des quantités pesées. Il a expérimenté sur le lapin, accessoirement sur des rats. Il observe les lésions avec un soin et une précision remarquables. C'est à ses observations qu'on doit le procédé de détermination du type humain et du type bovin sur le lapin : mais comme il n'a pas encore eu lui-même l'idée nette de cette distinction, il en résulte un certain trouble dans ses résultats.

Nous savons aujourd'hui que dans la tuberculose pulmonaire le bacille bovin est une rarissime exception, de sorte que 27 des cultures de Vagedes, sur 30, provenant de tuberculoses pulmonaires (des 3 autres, 2 provenaient de tuberculoses du bœuf, 1 d'un ganglion humain), il n'y a à peu près aucune chance qu'il ait eu en mains, sur ces 27 cultures, un bacille bovin. Il était donc fondé, jusqu'à un certain point, à les répartir, d'après l'étendue des lésions produites sur le lapin, en trois classes de virulence. Mais l'inoculation intraveineuse de bacilles humains au lapin produit des phénomènes assez irréguliers, selon la dose; et ce n'est pas seulement l'étendue des lésions qu'il faut considérer, mais la durée de vie de l'animal. Or, Vagedes les sacrifiait généralement à une époque où ils pouvaient avoir encore beaucoup de temps à vivre, malgé des lésions plus ou moins étendues, et sans qu'il y eût un rapport régulier entre l'étendue des lésions et la durée de survie.

Vagedes a montré que, dans quelques cas au moins, à une tuberculose d'allure bénigne semblait correspondre un bacille moins virulent. Mais plu-

(1) *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XXVIII, 1898, p. 276.

sieurs de ces cas « bénins » de l'homme se sont terminés tout à coup par une généralisation fatale (granulie); dans d'autres, la bénignité clinique était tout aussi bien attribuable à la situation sociale du malade, qui était riche et pouvait se soigner parfaitement. L'unique bacille de tuberculose ganglionnaire s'est montré peu virulent par inoculation dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, mais bien d'autres bacilles humains de tuberculoses pulmonaires se sont comportés de même. Enfin les différences de virulence établies par Vagedes sont faibles; aucun des 30 bacilles ne répond à l'idée qu'on se fait d'un vaccin.

Le travail de Krompecher et Zimmermann (1) est plus intéressant pour nous parce qu'il porte sur des tuberculoses humaines plus variées. Ces auteurs expérimentaient sur le lapin et avec des cultures pures. Ils ont grand soin d'employer des cultures isolées directement de l'homme et n'ayant pas passé par l'animal : depuis ce temps, beaucoup d'expériences ont montré que le passage par cobaye n'exerce pas d'influence notable sur les propriétés du bacille.

Krompecher et Zimmermann ont étudié des tuberculoses chirurgicales. Non seulement les bacilles leur paraissent à peu près égaux en virulence, mais la plus grande partie ont la même virulence que les bacilles de tuberculoses internes. La bénignité des tuberculoses est donc plutôt le fait de la localisation, du tissu, — peau, os, ou poumon, — que du microbe. Les tuberculoses atténuées ne sont pas le fait de bacilles atténués.

C. Fränkel et Baumann (2), après avoir prouvé que rien n'est plus irrégulier et inconstant que l'action d'un même bacille tuberculeux sur des lapins et sur des souris d'un même lot, éprouvent leurs 37 cultures sur des cobayes. Leur méthode consiste à inoculer toute une échelle de dilutions afin de fixer la quantité minima infectante, c'est-à-dire qui détermine une tuberculose plus ou moins rapide, mais sûrement progressive. Ils n'ont pas eu de bacille qui ne tuberculisât le cobaye à la dilution de 1 pour 1 milliard (en poids : 0,1 cent. cube de la dilution par 100 grammes d'animal); certains tuberculisaient à la dilution de 1 p. 100 milliards. Seul un bacille très ancien, entretenu en cultures sur milieux artificiels depuis les premiers travaux de Koch, ne tuberculisait qu'à la dilution de 1 p. 1000. Des passages n'en ont pas remonté la virulence; mais il n'a témoigné d'aucune efficacité vaccinante. Dans l'ensemble, C. Fränkel et Baumann n'admettent pas de relation entre l'allure aiguë ou chronique d'une tuberculose humaine et un degré déterminé de virulence du bacille.

Möller (3) conclut dans le même sens. Il cite un bacille lupus qui fut très virulent pour le cobaye. L'allure clinique de la tuberculose lui paraît déterminée par la localisation des bacilles. Il croit remarquer qu'une culture qui a vécu longtemps chez le cobaye est plus virulente pour le cobaye.

On verra plus loin les observations de la Commission anglaise.

Il paraît donc bien difficile de s'orienter sur la virulence des bacilles tuberculeux. Il n'existe pas de méthode plus exacte que l'observation du plus grand nombre d'individus possible et

(1) *Centrabl. f. Bakter.*, Orig., t. XXXIII, p. 580, 1903.
(2) *Zeitschr. f. Hyg. und. Infektionskr.*, t. LIV, 1906.
(3) *Zeitschr. f. Hyg. und. Infektionskr.*, t. LV, p. 506, 1906.

la comparaison des lésions anatomiques. A condition d'observer des séries assez étendues, les résultats ont une valeur scientifique.

Inoculés aux lapins selon la formule aujourd'hui classique (10 milligrammes sous la peau), divers bacilles humains donnent des lésions inégales : certains produisent une tuberculose pulmonaire étendue, sans généralisation aux autres organes, alors que d'autres ne donnent qu'une demi-douzaine ou même deux ou un seul tubercule pulmonaire. Il est difficile d'utiliser ces résultats à notre point de vue. Cependant un fait est bien net : les bacilles les moins virulents sur cobaye sont aussi les moins virulents pour les lapins.

Le procédé de Fränkel et Baumann ne m'a pas paru aussi sûr qu'à ses auteurs. A doses extrêmement faibles, des bacilles que la suite des expériences a prouvés inégaux en virulence se comportaient de la même manière : un petit ganglion inguinal, et pas de tuberculose progressive, même en un an d'observation, les différences ne ressortaient pas. Avec des doses fortes, 1 milligramme par exemple (toujours en inoculation sous-cutanée), inconvénient analogue à l'autre bout de l'échelle : les différences étaient pour ainsi dire noyées dans des lésions massives.

J'ai donc surtout employé, en maintenant toujours des termes de comparaison, les doses de 1/4, 1/100 et 1/1000 de milligramme, cherchant à produire une tuberculose progressive, ni trop rapide ni trop lente, telle que sur des cobayes assez nombreux, sacrifiés au bout de 8 à 10 semaines, on eût une expression de la virulence dans l'étendue des lésions. Les différences individuelles sont si fortes qu'on ne les compense qu'en faisant des séries nombreuses. Mais comme je visais surtout des différences de virulence considérables, je ne risquais guère de les laisser échapper.

Ni la grosseur des divers groupes ganglionnaires, ni la grosseur et même le degré d'infection de la rate, ne donnent la mesure de la virulence. Mais le poumon étant, après ces inoculations sous-cutanées, le dernier organe *visiblement* envahi, c'est l'état des poumons qui m'a paru marquer le mieux la rapidité et l'extension d'une tuberculose progressive. La durée de vie des cobayes inoculés dépendant de toutes sortes de

causes étrangères, je les sacrifiais au bout de huit à dix semaines, non sans en réserver quelques-uns que je sacrifiais plus tard. La dose de 1/4 de milligramme m'a rendu des services; lorsque après deux mois des cobayes inoculés avec cette dose massive n'ont pas de tubercules dans les poumons, le bacille ne peut manquer de retenir l'attention, et on l'étudie de plus près.

Je me dispense de rapporter en détail l'histoire des centaines de cobayes qui m'ont servi. Les résultats d'ensemble sont nets et c'est ce qui importe. Sur 42 bacilles, étudiés de près au moyen d'inoculations de doses variées sur de nombreux animaux, bacilles de ganglions du cou, tant d'enfants que d'adultes, bacilles de tuberculoses osseuses et articulaires, bacilles de poumon pris comme termes de comparaison, la plupart de ces affections étant cliniquement assez ou complètement bénignes, — aucun n'a pu être dit *atténué*.

Pas d'atténuation des bacilles de tuberculoses osseuses, à localisations simples ou multiples, par rapport à des bacilles de crachats provenant de tuberculoses pulmonaires en pleine activité. Je puis même affirmer que dans la majorité des cas la virulence des bacilles de tuberculoses externes est plus grande que celle des bacilles de crachats pris comme témoins. Bien loin que les tuberculoses osseuses et articulaires des enfants soient causées par des bacilles affaiblis, les faits prouvent que ces bacilles sont en pleine virulence, soit parce que l'organisme jeune leur résiste mal, soit parce qu'ils proviennent par contagion presque immédiate de tuberculoses actives, soit parce qu'ils sont doués d'une aptitude spéciale à se mobiliser et à se répandre, par la lymphe et le sang, dans l'organisme infecté.

Pas d'atténuation des bacilles de tuberculose ganglionnaire; ni chez *Bouch.*, fille de six mois, qui était le type même du nourrisson scrofuleux; ni chez *Pel.*, *Gra.*, *Léaq.*, *Mar.*, enfants de dix à treize ans, dont la santé générale était très bonne; ni chez *Zah.*, fille de dix-sept ans, qui avait bien résisté à un mal de Pott et guéri plusieurs adénites antérieures; ni chez *Tr.*, homme de trente-cinq ans; ni chez *Urs.*, femme de vingt-quatre ans, qui avait son adénite depuis huit ans; ni enfin chez *Desm.*, femme arrivée à l'âge de cinquante et un ans, avec une

masse ganglionnaire de 130 grammes dans l'aisselle : ganglions durs et fermes qui montraient à peine sur quelques points un début de caséification.

Pas d'atténuation chez les bacilles de deux lupus d'adultes; ni d'une gomme cutanée chez un enfant de deux ans et demi; ni d'une très vaste ulcération de la peau de la jambe chez *Peyr.*, garçon de treize ans (survenue à la suite d'un hématome causé par un coup de pied; le sujet avait une arthrite métacarpo-phalangienne tuberculeuse; il est mort depuis); ni du petit kyste mentonnier de *G.*, fille de huit ans; ni d'une gomme du bras chez un homme adulte.

Il existe des tuberculoses plus ou moins bénignes pour la santé générale du malade : c'est un fait clinique. Qu'il existe des bacilles atténués, c'est une autre question. Que la bénignité d'une tuberculose donnée soit l'effet d'un bacille atténué, d'après les observations qui précèdent, c'est faux. L'allure de la tuberculose paraît dépendre du terrain-sujet ou du terrain-tissu. Ne confondons pas tuberculose atténuée et bacille tuberculeux atténué.

Qu'est-ce donc que cette hiérarchie établie par certains auteurs entre les bacilles tuberculeux, et d'après laquelle le haut de l'échelle des virulences serait tenu par les bacilles des granulies et des méningites, suivis de près par les bacilles des tuberculoses pulmonaires; ensuite les bacilles des tuberculoses « chirurgicales », articulaires et osseuses; puis les bacilles des ganglions du cou; puis les bacilles des lupus...? Surtout sous cette forme simpliste, c'est pure fantaisie.

Les examens que j'ai rapportés montraient plutôt qu'on n'avait pas de chances de trouver dans les tuberculoses chirurgicales des bacilles sûrement atténués, et que si de tels bacilles existent, ils doivent être d'une rareté telle, que les découvrir ne peut être que l'effet du hasard. J'en ai rencontré un seul, qui m'a du moins donné la preuve que ces bacilles existent.

Sans eux, la tuberculose n'aurait pas d'autres déterminantes que la quantité du virus et la nature du terrain qui le reçoit, et les auteurs qui ne tiennent pas compte de la qualité du virus seraient dans le vrai. Ainsi, selon Preisich (1), c'est

(1) *Gesellsch. f. inn. Med. und Kinderheilkunde.* Vienne, 1911, n° 1.

une inoculation (inhalation ou ingestion) *massive* qui cause chez le nourrisson une tuberculose mortelle. Pour Römer, la phtisie pulmonaire de l'adulte a pour cause une réinfection grave ou des réinfections de masse moyenne, mais réitérées, surtout lorsque l'infection première a été grave, c'est-à-dire massive. Chez les cobayes et même chez les singes, selon Webb et Williams (1), on immunise au lieu d'infecter lorsqu'on inocule des doses minimes, commençant par l'unité, que l'on élève progressivement.

Sans doute la quantité des microbes a son importance, même dans la tuberculose expérimentale des animaux. Autrefois on inoculait des doses trop fortes; c'est avec de petites doses que l'on a des chances de produire chez l'animal une maladie plus semblable à celle de l'homme. Les très petites doses de bacille aviaire chez le lapin déterminent des localisations osseuses et articulaires (qui tiennent aussi à l'aptitude septicémique de ce bacille chez le lapin). Chez les cobayes inoculés avec des dilutions très étendues, comme celles qu'employaient C. Fränkel et Baumann, on observe souvent, en même temps que la rareté ou l'absence de localisations viscérales, des adhérences des plèvres et des adénopathies trachéo-bronchiques sans tubercules dans les organes. Chez les cobayes inoculés avec une goutte de pus très pauvre en bacilles, la tuberculose débute très lentement, puis, quand les bacilles se sont assez multipliés, elle marche avec la rapidité ordinaire : ce qui prouve encore l'importance de la quantité du virus. La quantité serait aussi le facteur prépondérant dans les tuberculoses de l'homme, s'il n'existait que des bacilles pleinement virulents.

III. — Exemples de bacilles atténués.

Z...., jeune homme de dix-neuf ans (hôpital Saint-Louis, service de M. Thibierge), a depuis l'enfance de la tuberculose cutanée sur la face externe du pied, la jambe et le genou. Evolution torpide, à la manière d'un lupus. En plusieurs années les lésions se sont peu étendues. Avant d'être vu par le

(1) *Journal of med. Research*, t. XX, f. 1, et t. XXIV, f. 1.

Dr Ravaut, assistant du service, le malade a été traité par les rayons X, sans aucun succès. Un fragment de tissu malade est inoculé à 3 cobayes, sous la peau. L'un de ces cobayes n'avait au bout de six mois qu'un très petit ganglion inguinal; un autre fut perdu pour des raisons étrangères à l'expérience; le troisième, au bout de trois mois et demi, avait de très petits ganglions inguinaux sans aucune lésion tuberculeuse dans les organes. Ces ganglions furent reportés sur deux nouveaux cobayes, dont l'un fournit après trois mois une culture pure. La première culture fut obtenue facilement (colonies en vingt-cinq jours sur pomme de terre glycérinée); aspect : type humain. D'après les inoculations au lapin, type humain (augmentation de poids et aucun tubercule dans les organes 70 jours après l'inoculation sous-cutanée de 10 milligrammes. Après inoculation de 1 milligramme dans la veine, léger amaigrissement, trois petits tubercules dans un poumon, quelques granulations sur les reins).

La première épreuve du bacille fut faite sur plusieurs cobayes qui reçurent 1, 1/2 et 1/4 milligramme; au bout d'un mois ils avaient beaucoup augmenté de poids, ne présentaient pas de chancre, aucun tubercule interne, sauf l'un qui avait trois petites granulations dans un poumon. Des cobayes témoins, inoculés avec un bacille de crachat et un bacille de ganglion du cou, avaient après un mois de gros ganglions caséeux, un chancre et de la tuberculose pulmonaire; le bacille de crachat était moins virulent que le bacille de ganglion.

Le bacille de Z. se montra aussi bénin chez des cobayes inoculés à deux reprises, et chez des cobayes inoculés antérieurement avec des doses minimes d'autres bacilles.

Avec des doses très faibles (de 0.0001 à 0.000.000.02 milligrammes) les cobayes n'ont eu que des ganglions inguinaux minuscules, sans tubercules dans les organes après trois à quatre mois et demi (sauf un seul cobaye, qui avait reçu 0.000.000.1 milligramme et qui présenta quelques fins tubercules dans le poumon et la rate). Même avec des doses fortes, les cobayes n'eurent jamais de chancre.

Je cherchai à confirmer les caractères de ce bacille en l'essayant sur diverses espèces animales, les unes naturellement très résistantes (lapin, rat), les autres très sensibles (ma-

caques) à la tuberculose humaine. La virulence s'est montrée sur toutes plus faible que celle de tous les bacilles témoins.

Des 60 origines inoculées au lapin, c'est celui qui a donné les moindres lésions : aucun tubercule deux mois et demi après inoculation de 10 milligrammes sous la peau ; seulement l'abcès local.

Des rats de 80 grammes environ n'ont pas accusé les différences de virulence avec des doses de 1 à 3 milligrammes. Mais des rats tout à fait jeunes, de cinq à huit jours, les ont très bien fait ressortir : alors que les bacilles de crachat ou de ganglion, bien virulents, donnaient une cicatrice au point d'inoculation, et des ganglions inguinaux, axillaires et trachéens, l'inoculation du bacille de Z., ne laissait aucune trace sur la peau, et aucun tubercule dans le poumon, seulement de minuscules ganglions.

Les expériences sur les singes sont frappantes. Alors que les autres bacilles ont tué les petits singes, — *sinicus*, *cynomolgus*, *rhesus* et même cynocéphales — en 70 jours au plus soit par inoculation sous-cutanée de 1 millionième de milligramme, soit par inoculation buccale de 1 milligramme, puis un mois après 2 milligrammes (la dilution était passée sur les muqueuses avec pinceau doux, qui ne produisait pas la moindre érosion), le bacille de Z. aux mêmes doses a laissé des survies considérables. Et quand on songe aux lésions étendues que supportent longtemps des animaux, même aussi sensibles que les singes, on doit croire que dans plusieurs cas, même en l'absence d'autres causes apparentes, la mort n'a pas été causée par la tuberculose.

Rhesus 202, inoculé sous la peau avec 1 millionième de milligramme, a une petite ulcération locale qui guérit complètement; un ganglion inguinal, du même côté, a suppuré, puis la fistule s'est fermée. Mort au bout de neuf mois, sans tubercules dans la rate ni le foie, *ce qui est exceptionnel chez les singes, qui meurent de tuberculose après inoculation par n'importe quelle voie*; dans le poumon, tubercules jeunes; abcès tuberculeux diffus, sus-cranien, étendu à l'orbite, et ayant perforé le crâne en deux endroits. Il faut dire que ce singe fut quelque temps dans la même cage qu'un autre singe inoculé avec un bacille virulent.

Rhesus 203, inoculé sous la peau du ventre avec 0,0001 milligramme, mort au bout de trois mois : localement, ulcération limitée à la peau et n'atteignant pas le muscle sous-jacent; gros ganglion inguinal suppuré. Dans les organes, tubercules extrêmement rares, *ce qui n'est pas le cas des singes qui succombent à la tuberculose*. On ne peut affirmer que ce singe ait succombé à des lésions si peu étendues.

Rhesus 205 a reçu dans la bouche 1 milligramme et un mois après 2 milligrammes (avec le pinceau). Mort le dixième mois, après avoir porté huit mois un paquet de ganglions sous-maxillaires, qui pendant les trois derniers mois allait diminuant de volume, avec amélioration de l'état de la peau.

Jamais pareille survie n'a été observée dans des conditions semblables chez les singes inoculés avec d'autres bacilles tuberculeux. A l'autopsie, seulement quelques ganglions mésentériques; semis de fines granulations tuberculeuses sur l'épiploon et sur le péritoine recouvrant les reins; tuberculose des deux poumons, mais presque tous les tubercules sont jeunes : le tableau n'est pas du tout celui d'une tuberculose intestinale, mais d'une généralisation *tardive* de la tuberculose des ganglions annexes de la bouche.

Les cobayes et les macaques sont si sensibles à la tuberculose qu'un bacille peut être atténué pour l'homme et le paraître à peine chez eux. On tirera bon parti, dans ces études, des cynocéphales (*Cyn. Sphinx*), beaucoup plus résistants que les macaques.

Avec les bacilles témoins, les cynocéphales inoculés au pinceau sur la muqueuse de la bouche (2 milligrammes) mouraient au bout de trois mois environ, avec de grosses lésions qui répondaient à la fois à une tuberculose par ingestion et à des accidents d'inhalation. Avec le bacille de Z., mêmes doses, des cynocéphales sont encore bien portants au bout de huit mois.

Cynocéphale 210 a reçu, à intervalles de un mois, 3 injections sous-cut., de 1 millionième, 1 millième et 1 centième de milligramme. La dernière injection seule a laissé une trace : une très petite ulcération déjà en partie desséchée au moment de la mort, survenue au cours du septième mois après la première inoculation. Autopsie : animal en bon état; petits ganglions mésentériques au centre du mésentère et le long de l'intestin (pas de bacilles tuberculeux sur frottis; on voit souvent de pareils ganglions, mous, chez des singes non tuberculeux); petits ganglions trachéo-bronchiques de la dimension d'une lentille.

Les poumons portent d'assez nombreuses taches grisâtres, qui ne donnent pas sous le doigt la sensation de granulations tuberculeuses; sur des coupes, pas de tuberculose des ganglions ni des poumons. Le singe n'est certainement pas mort de tuberculose.

Cynocéphale 206. Reçoit par la bouche 1 milligramme, puis (un mois après) 2 milligrammes, puis (trois mois après) 0,01 milligramme sous la peau. Au point d'inoculation se développe un nodule dur qui roule sous la peau. Ce nodule ne s'est jamais ulcéré et s'est complètement résorbé. A peine sent-on de tout petits ganglions inguinaux.

Ce singe meurt dix mois après le commencement de l'expérience, assez amaigri. On ne retrouve rien au point d'inoculation. Tous les organes sont indemnes de tuberculose. Tout petits ganglions inguinaux et axillaires. Petits ganglions mésentériques (mous) et sous-maxillaires. Il n'y a pas dans tous ces ganglions le plus petit point de caséification. Pas de bacille sur frottis. La mort ne peut être attribuée aux inoculations.

Il existe quelques exemples de bacilles atténués. La Commission anglaise en a trouvé dans plusieurs cas de lupus humain et de tuberculose du cheval. Sur 20 bacilles de lupus, dont 9 bovins et 11 humains, 7 bovins se sont montrés au-dessous de la virulence du bacille bovin, non seulement

pour le veau et le lapin, mais même pour le cobaye et les singes; et 4 humains étaient au-dessous de la virulence ordinaire du bacille humain pour le cobaye et le singe. Le degré d'affaiblissement des bacilles n'était pas en proportion de l'ancienneté du lupus. Dans la tuberculose du cheval, 2 bacilles (type bovin) sur 4 étaient au-dessous de la virulence habituelle.

Les bacilles atténués se rencontreraient-ils surtout dans les tuberculoses de la peau? Chez les singes inoculés sur la peau, la peau se défend bien et s'épaissit pour limiter par dessous la lésion locale, qui ne mord pas sur le muscle. Dans un travail où il est surtout question des possibilités de transformation du bacille bovin en bacille humain par un long séjour chez l'homme, E.-A. Lindemann (1) rappelle les observations de Kleine sur la bénignité des tubercules d'inoculation des ouvriers bouchers, et émet l'opinion que dans la peau humaine le bacille bovin se développe mal et se trouve exposé à des influences qui l'atténuent; ces influences ne s'exercent pas, selon lui, sur le bacille humain. On n'a pas encore assez étudié à ce point de vue les bacilles humains des tuberculoses cutanées. J'en ai isolé plusieurs qui étaient aussi virulents que des bacilles de crachats.

Le D[r] Mantoux et moi avons commencé, pour éclaircir cette question, des inoculations intracutanées de très faibles doses de bacilles (2). Nous avons été assez surpris de voir que l'inoculation dans la peau donnait plus rapidement des ganglions inguinaux caséifiés que l'inoculation sous-cutanée de la même dose, lorsque nous injections des bacilles bien virulents; mais le bacille Z. s'est montré d'une remarquable bénignité : après quatre mois, pas de chancre; il n'y a eu au point d'inoculation qu'une petite papule qui ne s'est jamais ulcérée et qui a guéri; des ganglions insignifiants; aucun tubercule interne. La dose était, dans ces inoculations, de 0,005 milligrammes. Cette méthode a confirmé de la façon la plus nette les caractères du bacille atténué.

(1) *Berliner klin. Wochenschr.*, 17 juin 1912, p. 1185.
(2) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, octobre 1912.

IV. — Oscillations de la virulence.

La première question qui se pose à propos des bacilles atténués est celle-ci : cette atténuation est-elle constante?

Parmi des bacilles atténués de la Commission anglaise, 3 bacilles bovins sur 8 ont repris par passages sur bovidés la virulence ordinaire des bacilles bovins pour les bovidés et les lapins; 1 bacille humain sur 4 a repris la virulence ordinaire pour le cobaye et le singe; 2 bacilles de tuberculose équine, sur 5, ont repris, par des passages qui durèrent jusqu'à huit années, la virulence du bacille bovin.

Le bacille de Z., repris d'un ganglion d'un rhésus sur lequel il avait vécu trois mois, éprouvé de nouveau sur cobaye, a paru plus virulent : la rate et le poumon contenaient des tubercules neuf semaines après l'inoculation de 1/4 de milligramme, ce qui n'était pas arrivé avec le bacille primitif.

La virulence de ces bacilles atténués est donc variable dans des limites qui ne sont pas encore bien déterminées; elle peut baisser et remonter; elle accomplit des oscillations. On ne risque pas de se tromper en affirmant que c'est une propriété générale des bacilles tuberculeux. Comme depuis plusieurs années on s'est surtout soucié de la transformation possible des bacilles bovins en bacilles humains, nous ne possédons pas beaucoup d'observations sur les oscillations de virulence; celles que nous avons sont d'autant plus dignes d'être retenues. Weber et Steffenhagen (1) rapportent l'histoire d'un enfant né de parents sains, élevé dans un milieu où il n'y avait pas de sujets tuberculeux, mais nourri au biberon avec du lait de vache qui bien souvent n'était pas bouilli. A deux ans, tuberculose du 4e métacarpien, avec bacille du type bovin. Aujourd'hui l'enfant a dépassé l'âge de 13 ans et la tuberculose est restée locale. De la 8e à la 13e année, 4 ensemencements et 4 examens du bacille ont été pratiqués : toujours il s'est agi de bacille bovin, *mais avec une virulence inégale*, et qui alla en s'élevant, surtout de la troisième à la quatrième prise. L'enfant ayant été soumis à des traitements variés, — agents

(1) *Tub. Arbeiten aus d. K. Gesundheitsamte*, 1912, f. 11, p. 419.

chimiques, Röntgen, Finsen, — peut-être n'a-t-on pas le droit d'exclure l'action de ces causes extérieures.

Les oscillations de virulence doivent être incessantes dans la nature au cours des passages entre les organismes et les milieux extérieurs. Comment n'auraient-elles pas une influence sur la maladie tuberculeuse? Un bacille qui passe sans intermédiaire du poumon d'un adulte dans la bouche d'un enfant a des chances d'être un bacille pleinement virulent. Le bacille qu'un enfant ramasse sur le plancher d'une chambre ou le sol d'une rue, peut l'être beaucoup moins. On a raison d'attribuer une importance à la *quantité* des bacilles qui s'ensemencent sur un organisme. Comment n'en pas accorder à leur *qualité*, puisqu'il est établi d'abord que les bacilles sont très inégaux en virulence, et de plus qu'il y a des oscillations de virulence? On ne peut d'ailleurs prédire que ces oscillations doivent rendre impossible l'emploi d'un vaccin antituberculeux lorsqu'on aura le bonheur d'en trouver un. Nous savons que les bacilles tuberculeux sont plus constants dans les cultures que dans la nature, et l'on conçoit très bien que les vaccins naturels puissent être fixés au laboratoire.

V. — Les inoculations négatives.

Tout le monde a fait des inoculations de matière tuberculeuse qui sont restées négatives. Il ne s'agit pas des cas où les cobayes n'ont pas été suivis pendant un temps assez long, ni des cas où la matière que l'on supposait tuberculeuse ne l'était pas en réalité (je n'ai eu qu'une surprise de ce genre : un gros ganglion carotidien de 38 grammes, que le chirurgien avait enlevé chez un homme de vingt et un ans pour arrêter des phénomènes douloureux, n'a pas donné de bacilles tuberculeux ni sur le cobaye ni en cultures, mais seulement une streptothricée, voisine de celle d'Eppinger) : il s'agit de cas où la tuberculose était sûre au point de vue clinique, et où des bacilles tuberculeux ont été vus dans la matière inoculée.

La Commission anglaise mentionne un lupus qui n'a rien donné chez le cobaye (*Final Report*, p. 16, en note). Ungermann (1) inocule un ganglion

1) *Tub. Arbeiten aus d. K. Gesundheitsamte*, f. 12, p. 215; 1912.

d'une fillette de dix ans scrofuleuse; le cobaye n'a rien pris. Eber (1), un ganglion du cou et une tuberculose osseuse, dont les inoculations sont restées négatives. Sur 28 adénites inoculées par Oehlecker (2), 14 seulement tuberculisèrent le cobaye : il est vrai que le diagnostic de tuberculose n'était pas donné comme certain dans tous les cas. En outre, Oehlecker (2), sur 3 cas de tuberculose cutanée, a eu affaire à un lupus et à une tuberculose verruqueuse de la peau qui n'ont rien donné au cobaye. Dans ses études sur l'infection des ganglions mésentériques et trachéo-bronchiques chez les enfants, Gaffky (3) cite deux cas où, les cobayes étant devenus tuberculeux, la culture n'a pas été possible; il pense que dans ces deux cas il s'agissait d'un bacille bovin.

Weber et Taute (4) ont observé 17 cas de tuberculose intestinale et mésentérique, *chez des enfants* de trois à neuf ans, où l'inoculation aux cobayes est restée négative, même après trois et cinq mois : il s'agissait de lésions en partie guéries, calcifiées ou crétacées. Dans 8 cas, des bacilles tuberculeux nombreux y avaient été vus au microscope. De plus, 13 cas analogues chez des adultes : là on doit faire une réserve, la calcification des ganglions pouvant provenir d'autres maladies que la tuberculose. Chez quelques-uns des cobayes inoculés, des bacilles ont été vus au point d'inoculation : étaient-ce des acido-résistants non pathogènes? Les essais de culture sont restés négatifs, et le report sur de nouveaux cobayes n'a rien donné.

Entre les cas où le bacille est seulement difficile à cultiver, et ceux où la tuberculose ne se développe pas, il y a des cas intermédiaires, et il ne faut pas oublier que parfois la tuberculose se développe, et même rapidement, après avoir hésité pendant des mois. Mais les cas négatifs existent, du moins dans les limites de nos plus longues expériences; ils ne sont pas très rares, et l'on ne peut s'empêcher de se demander quelle est leur signification.

Del..., lupus. Fragment inoculé à deux cobayes. L'un meurt au bout de six semaines : aucune lésion visible. L'autre au bout de quatre semaines, avec un ganglion inguinal de la taille d'un grain de chènevis, que l'on reporte sur un nouveau cobaye. Ce dernier, après cinq mois, a un petit ganglion, dont une partie est prélevée; on y voit des bacilles, moins rares que dans la grande majorité des pus qui tuberculisent rapidement les cobayes. Ensemencement : rien ne pousse. Le cobaye est sacrifié six mois et demi après l'inoculation : il a un ganglion inguinal minuscule, un très petit ganglion mésentérique contenant des bacilles, et une seule granulation grise dans un poumon. Les ganglions sont reportés sur un cobaye, qui malheureusement est mort d'une infection étrangère à la tuberculose, et sur un *Cynomolgus* qui au bout de cinq mois ne présente aucune lésion au point d'inoculation et aucun ganglion de l'aine ni de l'aisselle.

(1) *Centralbl. f. Bakt.*, Orig., t. LIX.
(2) *Tub. Arbeiten aus d. K. Gesundheitsamte*, f. 6, 1907, p. 145 et 183.
(3) *Tuberculosis*, t. VII, f. 9, p. 437; cité par Rothe, *R. Koch's Stift. Arb.*, f. 2, p. 2.
(4) *Tub. Arbeiten aus d. K. Gesundheitsamte*, f. 6, 1907; p. 24.

Beg..., kyste du cordon spermatique chez un garçon de deux mois : 4 cent. cubes de liquide citrin; inoculation à un cobaye, dans le péritoine. Le 117e jour, seulement un ganglion inguinal très petit, qui est prélevé stérilement, fragmenté, frotté sur plusieurs tubes à culture : rien n'a poussé. Vu des bacilles sur frottis. Report sur un deuxième cobaye, qui meurt le 130e jour sans lésion tuberculeuse visible, si ce n'est de minuscules ganglions (1 inguinal, 1 mésentérique, 1 trachéen) où l'on ne trouve pas de bacille. Mais six à huit semaines avant sa mort, le cobaye a eu un ganglion bien net, dont une partie, prélevée aseptiquement, a été reportée sur cobayes. Au bout de cinq mois, aucun ne paraît tuberculeux.

Sp..., garçon de dix-sept ans. Arthrite de la troisième articulation métacarpo-phalangienne. Le Dr Bailleul, chef de clinique du service de M. le professeur Kirmisson, d'après l'étude radiographique des surfaces articulaires, qualifie la lésion de rhumatisme tuberculeux. Ponction : 1,5 cent. c. d'un liquide louche, légèrement jaunâtre, vite coagulé, contenant en majorité des polynucléaires, le reste, mononucléaire et lymphocytes; vu 1 bacille tuberculeux sur une lame. Inoculé à deux cobayes.

Ces cobayes n'ont pu être conservés assez longtemps, soit parce que les animaux sont morts, soit parce qu'ils étaient très maigres et qu'on les a sacrifiés pour recueillir leur petit ganglion le plus purement possible; une série de passages a dû être faite. Mais jusqu'ici il a été impossible d'obtenir une culture et aucun cobaye n'est devenu tuberculeux, même sept mois après l'inoculation. L'un des deux premiers cobayes vit encore : il a eu un ganglion inguinal comme un petit pois assez notable pour qu'on en prélevât une moitié pour examen, essai de culture et réinoculation : on y a vu des bacilles. Les cultures n'ont rien donné. La réinoculation à un macaque est tout à fait négative après cinq mois.

Mig..., hydarthrose chronique, indolore, du genou : 20 cent. cubes de liquide riche en polynucléaires; les mononucléaires y sont en minorité, deux cobayes sont inoculés sous la peau et dans le péritoine. Dans le culot de centrifugation d'une moitié du liquide articulaire, il n'a pas été vu de bacille. Les cobayes ont eu de petits ganglions, dont l'un a été prélevé en partie, vu des bacilles sur frottis. Après six mois, les cobayes ne sont pas tuberculeux; ganglion inguinal à peine perceptible. Essais de culture du fragment du ganglion susdit, négatifs.

Laf..., demoiselle de vingt et un ans. Seconde poussée d'une adénite carotidienne, d'allure bénigne, 1,5 cent. cube de pus (vu 1 bacille après recherche assez longue); a été inoculé à des cobayes, sous la peau. Au bout de deux mois, l'un a un petit ganglion, qu'on est obligé de reporter sur un cobaye neuf (bacille sur frottis de ce ganglion). On le reporte aussi sous la peau d'un macaque. Au bout de quatre mois, ces animaux sont indemnes. L'autre cobaye donne lieu aux mêmes observations.

Mark..., fille de dix ans, vaccinée (en Pologne) à l'âge de deux ans; elle a, depuis cette vaccination, une tuberculose cutanée, très étendue, du bras, de l'avant-bras et de la main. Dix jours avant que je l'aie vue, l'enfant a reçu *une* seule application de rayons X. Il n'a pas été possible d'abord de prélever un fragment de tissu : j'ai dû me contenter du pansement, délayé dans de l'eau avec lavage rapide à l'antiformine. Quelque temps après, un petit fragment de peau a été prélevé et inoculé. Les cobayes ont eu au bout de plusieur semaines un petit ganglion inguinal, contenant des bacilles, qui a rétrocédé spontanément. Des transplantations ont dû être faites aussi dans ce cas afin de ne pas perdre la matière tuberculeuse. Aujourd'hui, aucun

signe de tuberculose chez des cobayes, huit et cinq mois après l'inoculation, soit sous la peau soit dans le péritoine. Deux cobayes ont été inoculés une seconde fois, sans plus de résultat. Un macaque n'a rien du tout au bout de cinq mois.

Voilà six cas dont l'histoire est à peu près la même : une lésion cliniquement tuberculeuse, bacilles aperçus dans presque tous les cas. Les cobayes, pour des raisons diverses, ne vivent pas assez longtemps, et la lésion bénigne qu'ils ont contractée — un ganglion lymphatique le plus souvent — est reportée sur cobayes et sur singes, animaux plus sensibles que le cobaye. Lors des transplantations, on examine le tissu transplanté, et l'on y constate l'existence de bacilles. Or, dans ces six cas rien ne s'est développé, même dans des délais prolongés de six et huit mois. Les essais de culture sont restés stériles. En sera-t-il de même dans la suite? il est possible que ces inoculations ne soient pas définitivement négatives; de toute façon, par comparaison avec tant d'autres cas de tuberculoses ganglionnaires, osseuses ou articulaires, ou même cutanées, ces tuberculoses, qui ne se sont pas développées sur cobaye ni sur singe, sont très remarquables.

Ces cas « négatifs » ne sont pas très rares, puisque j'en ai rencontré 6 sur environ 60 tuberculoses non pulmonaires. Tout indique qu'il s'agit là de bacilles atténués : les bacilles atténués seraient donc beaucoup moins rares que ne le laissent croire les inoculations et cultures positives.

Il n'y a pas de nécessité de recourir à une autre explication, — les granulations de Much, — puisque des bacilles tuberculeux ont été vus dans ces cas, avec leur forme et leur coloration classiques.

Dira-t-on que les bacilles aperçus d'étape en étape sont des acido-résistants non pathogènes? Il n'est pas possible de l'admettre, d'abord à cause du caractère clinique très net de la lésion originelle. Sans doute les ganglions que prennent les cobayes ne sont pas la preuve d'une tuberculose normale et virulente, même s'ils se reproduisent en série, tant qu'il ne se produit pas de tubercules à distance dans les organes : mais justement il ne s'agit pas de tuberculoses virulentes; et dans un cas il y avait dans un poumon une granulation tuberculeuse typique, de sorte que ce cas marque un degré intermé-

diaire entre les inoculations du bacille de Z. et les inoculations négatives ou presque négatives. Celles-ci prennent donc place dans une série naturelle, à côté des tuberculoses qui se développent plus ou moins lentement et sont plus ou moins difficiles à cultiver. Suppose-t-on qu'il s'agit de bacilles morts? C'est très possible dans les cas de Weber et Taute, qui ont inoculé des lésions calcifiées et crétacées, nullement dans nos cas où la tuberculose locale était en activité, où la lésion était récente, où s'est accompli chez le cobaye un début de développement.

A ces inoculations négatives de matière tuberculeuse, j'ajoute 3 inoculations négatives d'une lésion « scrofuleuse » dont la nature est encore discutée, la conjonctivite phlycténulaire. Avec MM. Terrien et Hillion, nous avons inoculé à des macaques (*sinicus* et *cynomolgus*), par insertion totale dans la chambre antérieure de l'œil et sous la conjonctive, et par friction sur la conjonctive très légèrement scarifiée, trois phlyctènes, choisies comme tout à fait caractéristiques. Après six mois, résultat nul.

La flore tuberculeuse est plus nombreuse et plus variée qu'on ne le croit d'ordinaire. Nous sentons tous les jours le besoin de perfectionner nos méthodes d'isolement et de culture, auxquelles bien des bacilles peuvent échapper. Si l'aptitude à se développer sur milieux artificiels ne donne pas la mesure de la virulence, il n'est pas possible qu'elle n'en soit pas au moins un élément, et dans les infections à bacilles humains, elle va généralement de pair avec elle. De sorte que pour avoir des chances de trouver ces bacilles atténués sur lesquels on fonde l'espoir de trouver des bacilles-vaccins, il faut les chercher surtout là où on ne les voit pas, car ceux qui, pour ainsi dire, sautent aux yeux, sont naturellement les plus faciles à isoler et les plus virulents.

Il existe, même dans les maladies tuberculeuses de l'homme, des bacilles atténués; et il existe chez les bacilles tuberculeux, comme chez toutes les bactéries pathogènes, comme chez tous les ferments, comme chez toutes les cellules, des oscillations d'activité et de virulence. Les inoculations négatives font entrevoir encore un degré inférieur dans l'aptitude à se

développer chez les animaux. On en trouvera sans doute d'autres exemples lorsque après avoir étudié les organismes infectés, on étudiera davantage le milieu extérieur, le sol, les planchers, les poussières de toutes sortes. C'est comme une sous-flore tuberculeuse qui ne peut être sans importance dans l'éclosion et l'évolution de la tuberculose. A côté des bacilles qui passent, sans intermédiaire, d'un homme à l'autre, d'une nourrice malade, par exemple, à son nourrisson, il y a des bacilles atténués qui s'implantent moins facilement, il y en a qui végètent plus pauvrement encore : ce peut être celui qu'un enfant ramasse en jouant, sur le plancher de la chambre ou à la promenade. Tel bacille affaibli peut reprendre sa virulence : mais s'il la reprend lentement, progressivement, il a le temps de modifier l'organisme sur lequel il évolue. Si certains humains résistent indéfiniment à des contagions qui en tuent d'autres, c'est qu'ils ont été ensemencés d'abord avec des bacilles qui leur ont conféré une résistance suffisante.

Plusieurs observateurs ont fait appel implicitement à une pareille explication. Römer (1) note la rareté de la contagion tuberculeuse entre adultes, grâce à laquelle les sociétés d'assurances acceptent des personnes chargées d'antécédents de tuberculose même lorsque ces personnes vivent ou ont vécu avec un conjoint tuberculeux. Petruschky (2) dit n'avoir jamais observé de contagion matrimoniale. Jacob (3), au cours de ses enquêtes, n'a pas observé de cas de mort, par tuberculose, du second mari d'une femme saine dont le premier mari était mort de tuberculose. Römer rappelle le cas rapporté par Metchnikoff et ses collaborateurs, d'un homme arrivé indemne à un âge avancé, après avoir été longuement exposé à la contagion la plus immédiate et la plus dangereuse.

Les faits suivants sont encore plus intéressants à notre point de vue. D'après les enquêtes de Jacob, les enfants des maisons où il y a des cas de tuberculose ouverte réagissent toujours à la tuberculine, mais il y a aussi des enfants qui réagissent dans des milieux où l'on ne trouve aucune cause

(1) Kritisches und antikritisches z. Lehre v. der Phtiseogenese. *Beitr. z. Klinik der Tub.*, t. XXII, f. 3.
(2) *Vorträge über Tuberkulosebekämpfung*, 1911 ; cité par Römer.
(3) *Die Tub. und die hygienischen Misstände auf dem Lande*, 1911.

d'infection. Les enfants ont réagi dans la proportion de 30 à 40 p. 100 dans des villages où il n'y a pas eu depuis des années un seul cas de phtisie. « Encore une preuve, dit Römer, de l'extraordinaire extension des chances d'infection, extension dont nous ne pouvons pas toujours nous rendre compte. » Dans une contrée des plus saines, des plus pauvres en tuberculose, où la mortalité par tuberculose ne dépasse pas 9 p. 10.000, et spécialement dans six communes où l'on n'avait enregistré depuis dix ans aucun décès de tuberculose, Hillenberg (1) a trouvé 25 p. 100 des enfants réagissant à la tuberculine, et conclut que « les bacilles tuberculeux doivent être beaucoup plus répandus dans la nature qu'on ne le croit généralement ». Peut-être, ajoute Römer, les tuberculeux latents contribuent-ils à la propagation de la maladie de quelque façon qui nous est inconnue. Par exemple, si l'on introduit dans une étable indemne de tuberculose un animal qui réagit à la tuberculine, toute l'étable s'infecte, car toute l'étable réagit, bien que l'animal introduit n'ait aucune tuberculose clinique et qu'on ne puisse démontrer par les méthodes usuelles qu'il élimine des bacilles.

Calmette a bien vu le problème ; il est possible, dit-il, que « beaucoup d'hommes auxquels une infection bénigne antérieure ou restée latente a conféré une immunité relative, soient susceptibles, tout en restant eux-mêmes en apparence parfaitement indemnes, de semer dans leur entourage des germes virulents (2). Il s'appuie sur des faits qu'il a observés avec Guérin : l'élimination, par les émonctoires normaux de l'organisme (foie et intestin) et avec les excréments, de nombreux bacilles virulents, chez des bovidés rendus résistants par une des méthodes de vaccination actuellement connues, ou par une infection bénigne restée occulte (3).

D'après ces observations, il y aurait pour la tuberculose, comme pour tant d'autres maladies infectieuses, des porteurs de germes au sens strict du mot, c'est-à-dire des individus qui abritent et répandent des bacilles sans avoir des symptômes actuels de maladie. Mais dans ces contagions qui ne se manifestent pas, comment croire qu'il n'y ait en jeu que des bacilles

(1) Weit, Beitr. z. Entstehung u. Verbreitung der T., *Tuberkulosis*, 1911, f. 7.
(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, f. 7, p. 497.
(3) *Ibid.*, t. XXV, f. 9, 25 sept., 1911, p. 625.

virulents? Les faits indiquent le rôle des bacilles atténués et de cette sous-flore tuberculeuse que nous commençons à étudier. Les conditions dans lesquelles se produit la sensibilité à la tuberculine sont encore trop mal connues pour qu'on ait le droit de l'attribuer uniformément à la présence de bacilles virulents et de lésions actives. Je me propose de continuer l'étude de la flore tuberculeuse, non seulement dans les organismes, mais aussi dans le milieu extérieur, afin de contribuer à la connaissance de cette immunité spontanée qu'il faudra bien réussir un jour à imiter par une méthode préventive, applicable avant tout à l'enfance.

Conclusions.

Sur 35 cas de tuberculose articulaire, osseuse, cutanée, et 23 de tuberculose des ganglions du cou, il n'a pas été trouvé un seul bacille du type bovin.

Eprouvés (cultures pures) sur des cobayes et des singes, les bacilles de ces tuberculoses ont montré autant de virulence que des bacilles de crachats, et dans beaucoup de cas une virulence plus grande.

La bénignité d'une maladie tuberculeuse n'est donc pas l'effet nécessaire d'un bacille atténué.

Il existe des bacilles tuberculeux atténués. Ils sont très rares. Jusqu'ici on les a trouvés dans des tuberculoses de la peau.

La virulence des bacilles tuberculeux accomplit des oscillations, dans la nature, au cours des passages entre les organismes et les milieux extérieurs.

La gravité d'une infection tuberculeuse dépend (sans parler de l'organisme) non seulement de la quantité, mais aussi de la qualité des bacilles incorporés.

Dans de nombreux cas (presque le dixième), l'inoculation de matière tuberculeuse reste négative, sans qu'on puisse attribuer l'insuccès à l'absence de bacilles, ni à la présence de simples acido-résistants : il s'agit de bacilles *atténués*, soit d'emblée lors de leur pénétration dans l'organisme, soit dans l'organisme par le fait d'un travail de guérison.

La flore tuberculeuse est plus nombreuse et plus variée

qu'on ne croit; nos méthodes d'isolement et de culture laissent échapper beaucoup de bacilles.

Il existe une sous-flore tuberculeuse dont le rôle dans la maladie tuberculeuse est encore indéterminé.

Ces faits expliquent les cas d'immunisation spontanée vis-à-vis de la tuberculose et confirment la possibilité d'une vaccination artificielle.

C'est M. Metchnikoff qui m'a engagé à suivre cette idée directrice de l'immunisation spontanée et des vaccins naturels; qu'il me soit permis de lui exprimer mon affectueuse gratitude.

TRYPANOSOMIDE D'UN RÉDUVIDE

(*CONORHINUS RUBROFASCIATUS*)

INOCULABLE AU RAT ET A LA SOURIS (1)

par le Dr A. LAFONT

Médecin-major de 1re classe des Troupes coloniales.

Travail du *Bacteriological Laboratory* (île Maurice) et du service de M. le professeur Mesnil, à l'Institut Pasteur.

(Avec les Pl. XIX et XX.)

Le point de départ de cette étude est la recherche de l'arthropode convoyeur de la « *Flagellose* » des petites euphorbes que j'ai découverte à Maurice en 1909 (2).

Parmi les espèces d'hémiptères rencontrées aux diverses saisons sur les plantes parasitées (*Nysius euphorbiæ*, *Dieuches humilis*, *Lachnophorus guttulatus*, *Corizus hyalinus*), se trouvaient de grands hémiptères sombres (Lygéides), rappelant les Réduves. On pouvait se demander si des Réduves, à l'état de larves, de nymphes ou d'adultes, ne se retrouveraient pas sur nos euphorbes qu'elles auraient contaminées. Cette recherche a été négative jusqu'ici, mais elle attira notre attention sur un hémiptère dont nous apprîmes l'existence dans le pays : grande punaise brune s'attaquant à l'homme.

L'important mémoire de Chagas sur *Conorhinus megistus* et son parasite nous fit rechercher avec soin l'espèce mauricienne. Mais pendant une année (1909-1910), nous tentâmes vainement de nous procurer un seul de ces insectes.

En mai 1910, nous pûmes nous procurer à prix d'argent un premier spécimen. Comme nous l'avions pressenti, il s'agissait

(1) Note préliminaire dans *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXII, 1912.

(2) Voir ces *Annales*, t. XXIV, 1910.

bien d'une Réduve d'assez grande dimension, appelée à Maurice « *Punaise maupin* » (1).

La détermination faite par M. D'Emmerez, directeur du Muséum de Port-Louis, fit reconnaître qu'on avait affaire au *Conorhinus rubrofasciatus* (2).

Disons de suite que nous avons retrouvé cet hémiptère à la Réunion, que nous en avons reçu des spécimens des Seychelles, dus à l'obligeance de M. Lasnier, consul de France à Mahé, et qu'on nous en a affirmé l'existence à Madagascar (littoral) et dans l'archipel des Comores.

A la Réunion, l'insecte est désigné par altération sous le nom de « *Punaise morpin* ».

Nous étudierons plus loin la biologie du *Conorhinus* (v. p. 915).

I. — FLAGELLÉS PARASITES DE LA RÉDUVE

L'intestin de cette Réduve renferme à Maurice, dans 80 p. 100 des individus, et dans 50 p. 100 à la Réunion, des Flagellés très polymorphes et souvent en nombre prodigieux.

Étude du parasite a l'état frais.

Une goutte du contenu intestinal, mis entre lame-lamelle, montre de nombreuses formes pâles, allongées, se déplaçant parmi des cristaux blanchâtres ou des débris noirâtres à mouvements browniens.

1° Parmi ces formes, les unes ont le corps rigide et se déplacent tout d'une pièce, le flagelle en avant ; à première vue, elles ressemblent à des *Leptomonas*. Il y en a de toutes les dimensions, de toutes les tailles, de très allongées, d'autres très courtes, ou des formes arrondies, globuleuses, etc. Elles paraissent souvent avoir un rudiment de membrane ondulante, ce qui fait penser aux formes *Crithidia*. Un certain nombre d'entre elles se déplacent en ondulant et sont semi-rigides.

(1) Cette appellation indigène « *Punaise maupin* » ou « *morpin* » provient du Gouverneur français Maupin, qui fut piqué par cette Réduve et eut un anthrax à la suite de la piqûre.

(2) La détermination de M. D'Emmerez a été confirmée par M. Besnard, du Muséum, après entremise obligeante de M. Gravier, et par notre ami Edm. Bordage, chef des Travaux à la Sorbonne.

2° On rencontre aussi, tantôt très rares, tantôt très nombreuses, de petites formes se tortillant sur place comme des vers, avec mouvements d'extension et de rétraction. Ce sont des *trypanosomes* de petites dimensions. Ces petits trypanosomes évoluent sur place, comme s'ils étaient gênés par le contenu intestinal ou comme s'ils sortaient d'un kyste; leurs mouvements sont vifs, rapides. Ils semblent aussi se détendre comme des ressorts pour traverser très vite le champ du microscope.

3° On voit enfin des formes arrondies et des formes allongées, immobiles ou à mouvements très lents. Des individus géants étonnent par leur dimension ou par leur forme renflée, en volute, en grenade, etc. Des amas considérables de formes arrondies ou kystiques ne sont pas rares ; des groupements de parasites enchevêtrés s'observent également dans la portion inférieure de l'intestin.

La répartition exacte du parasite le long de la muqueuse intestinale reste encore à préciser.

Ces diverses formes du parasite se retrouvent rarement dans l'estomac de la Réduve, bien que j'aie pu y constater leur présence très nettement en plusieurs occasions et parfois en grand nombre.

Contenu stomacal. — Le contenu de l'estomac de l'insecte se présente très souvent comme une masse compacte, rougeâtre, ayant la consistance du mastic, facilement énucléable et très difficile à étaler.

En diluant ce mastic rougeâtre dans du sérum d'un animal (cobaye, lapin, équidé, etc.), de préférence au sérum physiologique, on obtient d'excellents étalements, faciles à colorer, où cristaux et globules sanguins sont parfois encore reconnaissables.

Certains estomacs renferment du sang déjà hémolysé en totalité ou en partie. Chez les larves, le sang est rapidement hémolysé après le repas.

Contenu intestinal. — Le contenu de l'intestin varie selon la partie que l'on examine.

1° La portion avoisinant l'estomac renferme quelquefois un liquide rougeâtre, particularité qui facilite les examens à l'état frais.

2° L'intestin moyen abrite le plus souvent un liquide noir comme de l'encre et montre parfois, dans sa portion inférieure, un renflement en ampoule, à contenu également noirâtre, plus ou moins fluide, plus ou moins visqueux et fourmillant de parasites plus ou moins mobiles.

3° L'intestin postérieur ou ampoule rectale tranche nettement par son contenu assez abondant, à coloration jaunâtre dans son ensemble, sur le reste de l'intestin.

Ce contenu, vu au microscope, est formé par des milliers de petits grains ordinairement blanchâtres, quelquefois colorés, ressemblant à un feutrage serré de grains d'amidon, et qui sont en réalité des cristaux d'urate de soude. Les Flagellés, toujours beaucoup plus rares dans cette portion terminale, se meuvent avec lenteur ou se présentent sous la forme arrondie ; mais il m'est arrivé, en pressant l'extrémité de l'hémiptère pour ne pas le sacrifier, d'obtenir une goutte de liquide jaunâtre et grumeleux fourmillant de parasites. Notons ici que ces Flagellés se colorent fort mal et paraissent en voie de destruction.

Sérosité de l'insecte. — Par contre, dans le sang ou sérosité de l'insecte, recueilli après section d'un membre, d'une antenne ou après décapitation, je n'ai jamais observé de Flagellés.

Les frottis frais des glandes salivaires se sont aussi montrés négatifs.

Localisation du parasite. — Le parasite nous a paru localisé surtout à l'intestin, très rare dans l'estomac et absent des glandes salivaires, des tubes de Malpighi, des ovaires et de la cavité générale. Nous avons cru en voir dans des frottis des organes génitaux mâles, mais une trace infime du contenu intestinal a pu venir fausser notre préparation et nous induire en erreur.

Conservation entre lame-lamelle à l'état frais. — Sur des préparations multiples, paraffinées ou non, nous avons pu conserver et suivre le parasite quatre jours environ. Nous l'avons vu vivant et mobile, parfois ébauchant une division ou formant des amas mobiles ; mais bientôt les grandes formes devenaient granuleuses, ralentissaient leurs mouvements ou prenaient la forme globuleuse. Les microbes envahissaient les lames, déterminant la mort, la dissolution ou l'enkystement du parasite.

Étude du parasite après coloration.

Nous nous sommes servis de préférence du colorant de Leishman, dont l'action est plus rapide et moins incertaine que celle du Giemsa, surtout aux Colonies. Les parasites colorés ont leur protoplasma variant de la teinte bleuâtre à la teinte lilas ou rose violacé; ces différences de tonalité peuvent tenir aux temps différents de la coloration aussi bien qu'au degré d'acidité ou d'alcalinité des dilutions du contenu intestinal de la punaise maupin.

Le *blépharoplaste* ou centrosome a pris habituellement la teinte violet foncé, parfois virant au noir; le *noyau* s'est coloré en rouge foncé ainsi que le *flagelle*. Nous notons ces teintes une fois pour toutes.

Sur lames colorées, nous n'avons qu'exceptionnellement des formes *Leptomonas*. Celles qu'à l'examen direct nous avions prises pour des *Leptomonas* étaient en réalité des formes *Crithidia*.

Nos lames renferment donc :

1° Des formes *Crithidia*, très variées;

2° Des formes *Trypanosoma*;

3° Des formes arrondies ou globuleuses ;

4° Des formes kystiques particulières, allongées ou fusiformes ;

5° Des formes variées en voie de division ;

6° Des formes anormales.

Nous allons les décrire successivement avec leurs dimensions et leurs particularités.

Il suffira du reste d'examiner les planches jointes au mémoire pour s'en faire une idée d'ensemble.

A. — Formes Crithidia. Elles présentent des formes courtes, moyennes et longues.

a) Les *formes courtes* ou légèrement allongées varient en longueur de 7,8 μ à 9,8 μ sans flagelle. Leur largeur est de 1,4 à 2,8 et dans les cas extrêmes assez rares 4,2 μ; elles sont alors renflées. Le flagelle libre atteint 4 à 5,2 μ. La longueur totale est ainsi de 11 à 15 μ.

Le *blépharoplaste* va de 0,5 à 1,4 dans sa plus grande lon-

gueur et de 0,2 à 0,7 μ dans sa plus grande épaisseur. C'est le plus souvent un bâtonnet régulier, situé au-dessous du noyau auquel il paraît presque adhérer en bien des cas; il peut aussi s'étrangler à sa partie moyenne. Mais ses dimensions sont parfois inappréciables tant il est petit; ou bien il devient globuleux, arrondi irrégulièrement. Cette dernière forme est plus rare.

Le *noyau*, moins fortement coloré, se présente ici comme une petite masse granuleuse, souvent compacte, tantôt placée transversalement, tantôt longitudinalement ou dans une orientation intermédiaire.

En position transversale, le noyau peut occuper toute la largeur du parasite; dans les autres sens, il laisse une marge appréciable. Sa plus grande longueur va de 1,4 à 2,8 μ et sa largeur de 0,7 à 1,8.

La distance de la face postérieure du noyau à l'extrémité postérieure du parasite oscille entre 1,4 et 3 μ en moyenne, pour atteindre quelquefois jusqu'à 5-6 μ.

L'*extrémité postérieure*, variable de forme, peut être effilée, obtuse ou franchement arrondie.

Le *protoplasma* se prolonge presque toujours le long du flagelle, en une mince membrane qui est rapportée, dans les mensurations, au corps du parasite.

Quant au *flagelle*, vigoureusement marqué, il peut traverser en partie le corps du flagellé pour venir, presque sans exception, border finalement sa face convexe.

La *membrane ondulante*, parfois à l'état d'ébauche, est quelquefois bien marquée, mais sans grandes ondulations (fig. 1 à 6 et fig. 15).

b) Les *formes moyennes*, rigides et de belle tenue, ne sont pas toujours arquées. Elles atteignent 16 à 25 μ, flagelle compris. Le flagelle oscille de 2 à 7. La largeur est de 1,4 à 2,8 ; le blépharoplaste, long de 0,8 à 1,4, épais de 0,2 à 0,5, est orienté transversalement et collé ou juxtaposé au noyau. Ce dernier mesure de 1,2 à 2,8 en longueur et 1 à 1,4 en largeur. Il forme une masse arrondie ou quadrangulaire. Sa distance à la partie postérieure du parasite atteint de 3 à 7 μ. Quand le noyau n'est pas transversal, sa distance à l'une des faces latérales peut atteindre 1 μ.

Mêmes remarques que précédemment pour les extrémités, le flagelle, la bande de protoplasma qui l'accompagne et la membrane ondulante plus accentuée (fig. 7 à 13).

c) Les *formes longues*. — Ces formes, flagelle compris, vont de 25 à 50 μ et au delà et sont larges de 2 à 4,2. Rubannées ou arquées, elles sont remarquables par le prolongement d'une bande étroite de protoplasma accompagnant le flagelle ou par les plissements de la membrane ondulante. On ne sait plus parfois où se termine exactement le corps du parasite et les mensurations en sont rendues difficiles. Cette bande protoplasmique peut en effet atteindre un développement de 10 à 12 μ pour une largeur inférieure à 1 μ.

La partie libre du flagelle donne une moyenne de 4,2 à 12,6. Il y a même des cas où le flagelle libre paraît atteindre le tiers à la moitié du corps du parasite.

A peine esquissée dans les formes précédentes, la membrane ondulante est ici parfois très nettement représentée.

Le *blépharoplaste*, collé ou juxtaposé au noyau, en position longitudinale ou oblique, est épaissi ou arrondi. Ses dimensions varient de 0,7 à 1,4 et de 0,3 à 0,5 μ.

Le *noyau* se présente en certains cas comme un bloc compact, ovale ou quadrangulaire, parfois presque carré, placé en travers ou en long, remplissant ou non toute la largeur du flagellé. Ses dimensions peuvent être les mêmes en tous les sens. Le noyau varie de 1,4 à 2,8 et au delà en longueur et de 1,4 à 2,8 en largeur ou épaisseur. Il est aussi granuleux à l'intérieur ou sur les bords et l'on peut arriver parfois à compter à l'intérieur les chromosomes, groupés irrégulièrement ou reportés à sa périphérie. Selon sa position dans le parasite, il peut laisser libre à son niveau une notable partie du protoplasma.

Dans ces grandes formes, on assiste à toutes les phases de migration du noyau et du blépharoplaste, à la recherche de leur position définitive. Aussi la distance du noyau à l'extrémité postérieure varie de 6 à 18 μ et au delà (fig. 14 et 16 à 22).

Cette extrémité postérieure, généralement arrondie ou obtuse, peut s'effiler (fig. 22). Ceci est intéressant à noter en vue des particularités que nous observerons par la suite dans les expériences d'inoculations aux petits animaux.

Fait remarquable : dans toutes ces formes que nous venons de décrire, on n'observe presque pas de divisions.

Parmi les *Crithidia*, petites, moyennes ou grandes, on en rencontre qui présentent des vacuoles plus ou moins nombreuses dans leur protoplasma, ce qui peut tenir à des inégalités de coloration, à des phénomènes d'altération ou de dégénérescence.

Il se trouve aussi des formes, assez nombreuses, présentant une strie blanche longitudinale, allant d'un bout à l'autre du protoplasma, comme si le parasite allait se dédoubler. Sur nos dessins, cette zone blanche tranche remarquablement sur l'azur du protoplasma et atteint environ 1 μ de largeur. Cette particularité nous a longtemps intrigué ; nous verrons plus tard quelle explication plausible on peut en donner (fig. 1, 5, 6, 11, 16).

B. — Formes Trypanosoma. Nous avons noté plus haut les caractères de ce trypanosome, ainsi que sa petitesse et ses variations à l'état frais.

Coloré, le parasite présente les caractéristiques suivantes :

1° *Un très gros blépharoplaste* violet foncé, arrondi ou très légèrement allongé, occupant l'extrémité terminale ou subterminale postérieure ;

2° *Un noyau volumineux*, très allongé, le plus souvent fortement coloré, placé longitudinalement et collé contre la face concave du parasite, du moins dans la plupart des cas ;

3° Une très courte distance, qui peut être inappréciable, sépare l'extrémité postérieure du noyau du blépharoplaste.

La constance de ces trois caractères suffit, selon nous, à différencier ce petit trypanosome des espèces connues (fig. 24 et 26).

Le *flagelle* longe le plus souvent la face convexe du parasite et présente plus ou moins d'ondulations. La membrane ondulante qu'il borde se colore à peine et offre un espace blanchâtre des plus nets.

Le trypanosome, dans son ensemble, est la plupart du temps arqué, tordu, ployé ou recroquevillé sur lui-même.

Voici ses dimensions : sa longueur sans le flagelle est de 7 à 8 μ pour les plus beaux individus ; sa largeur est de 1,4 à 2,8.

Exceptionnellement on voit des spécimens ayant une longueur double.

Le flagelle libre varie de 1 à 10 μ et la longueur totale oscille entre 9,7 et 21 avec moyenne de 14 à 15 μ.

Blépharoplaste long de 0,7 à 1,4 ; large de 0,3 à 1.

Très rarement, il se trouve à quelques μ de l'extrémité postérieure et on peut alors penser à des formes de transition entre les petites formes et les formes crithidia moyennes (fig. 27).

Noyau atteint de 2 à 4,2 μ d'une part et 0,4 à 2 de l'autre. Très rarement, sauf dans des formes mal différenciées encore, ce noyau peut être globuleux ou en position légèrement oblique. On peut mesurer entre les deux noyaux une distance de 0,2 à 0,7 μ.

Cette même distance chez *Tr. Duttoni*, espèce propre à la souris, est remarquable par sa constance et mesure 6 à 7 μ, d'après Thiroux (1). J'ai pu du reste m'en rendre compte moi-même sur une lame de sang de souris (provenance : Italie) de la collection de M. Mesnil.

A son tour, la distance de la face postérieure du noyau à l'extrémité postérieure varie de 0,3 à 7 μ (formes de transition). La moyenne est de 2 à 3.

De plus, appliqué contre la face concave ou très rapproché d'elle, le noyau est distant de 0,7 à 2,8 de la face latérale convexe ; il peut aussi, mais très rarement, se trouver au milieu du parasite.

Toutes ces dimensions ont été notées avec le plus grand soin pour bien caractériser ce trypanosome.

C. — Formes arrondies. Elles se présentent isolées, plus souvent par deux, et aussi en amas immenses ; elles ressemblent à première vue à des kystes. Mais je ne crois pas que ce soit là la véritable interprétation à leur donner. Elles sont généralement rondes, presque sphériques, ovalaires ou irrégulières.

Leurs dimensions en longueur vont de 4 μ pour les plus petites à 12-14 pour les plus grandes. La largeur varie de 2,8 à 7 et 9,8 avec un blépharoplaste long de 0,7 à 1,4 ; large de 0,2 à 0,7. Le noyau mesure dans un sens 1,4 à 2,8 et dans l'autre 1 à 2 μ.

Quant à l'éloignement du noyau de la face postérieure, là où il est possible de faire des mensurations, il est de 0,2 à 7 μ.

(1) Thiroux, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, septembre 1905.

Blépharoplaste et noyau occupent toutes les positions à l'intérieur du corps (centrosome longitudinal, oblique, perpendiculaire).

Certains de ces petits parasites rappellent, mais de loin, certaines formes de *Leishmania*.

Le flagelle souvent ne dépasse pas l'intérieur du parasite, mais sa partie libre, quand elle existe, atteint parfois de 1,4 à 30,8 μ, dimension extrême.

Parmi ces formes, les unes — les plus petites — s'observent surtout dans l'ampoule rectale et paraissent être tout au moins des formes de résistance ; les autres, plus grosses, plus ou moins régulières et à court flagelle, se retrouvent dans la portion de l'intestin rempli de matière noirâtre sise au-dessus du rectum ; elles rappellent des formes grégariniennes (fig. 34 à 43).

D. — Kystes fusiformes. Ce sont les éléments les plus curieux du contenu parasitaire intestinal de la punaise maupin.

A l'état frais, ces kystes sont masqués sur les préparations par les nombreux pigments ou cristaux de l'intestin et n'attirent pas l'attention.

Colorés, ils sont allongés, *fusiformes*, parcourus dans toute la longueur par une strie claire qui peut occuper du 1/3 au 1/4 de la surface du kyste. Tantôt cette strie claire occupe la surface du fuseau sans atteindre ses pôles, tantôt elle atteint l'une ou l'autre extrémité. Dans ce cas, le kyste paraît fendu dans le sens longitudinal, ou mieux entr'ouvert légèrement comme les valves d'un coquillage.

Le kyste prend en général une coloration bleuâtre sur laquelle tranche avec netteté la zone claire. Le parasite, quand on le voit bien, occupe dans toute sa longueur un côté ou le milieu du kyste et a l'aspect d'un fuseau aciculé à ses deux bouts. Un gros noyau granuleux et un petit blépharoplaste arrondi ou linéaire d'où part un très court flagelle occupent généralement son extrémité antérieure et sont très visibles.

Interprétations de la strie blanche longitudinale (formes crithidia et éléments fusiformes).

Il peut s'agir d'une empreinte sur le corps du parasite pendant sa libération du kyste ou mieux d'une zone de moindre épaisseur autour de laquelle le flagellé se replierait comme une charnière. Quoi qu'il en soit, cette particularité éveille

l'idée d'un rapprochement entre ces deux formes et fait penser à une relation entre elles (fig. 1, 6, 11 et 46-49).

Peut-il y avoir deux parasites dans ces corps fusiformes ? Il m'a semblé une fois ou deux voir deux parasites, mais, étant donnée la rareté du fait, je ne saurais émettre une affirmation absolue à ce sujet (fig. 32).

Comme dimensions du kyste, j'ai noté 7 à 14 μ en longueur et 1,4 à 5,6 en largeur. Je n'insisterai pas sur celles du parasite.

E. — Formes variées en voie de division et formes anormales. Ces formes, avons-nous dit plus haut, sont en général rares et à division à peine ébauchée. Pourtant, sur nos lames, on retrouve des petites formes arrondies, voisines de celles du kala-azar ou plus grosses, généralement avec deux petits noyaux et deux centrosomes. Les centrosomes occupent une position inverse par rapport l'un à l'autre. Ces formes de division ne sont pas rares sur nos préparations.

D'autres échantillons ont en plus deux très courts flagelles, parallèles ou croisés, et souvent de dimension inégale, ne dépassant pas le corps du parasite ou émergeant de quelques μ seulement. Avec deux centrosomes, on peut rencontrer un seul noyau, volumineux, épaissi et irrégulier, formant bloc. Inversement, il peut exister deux gros noyaux avec un seul centrosome ovalaire donnant naissance à un flagelle unique ou à deux flagelles inégaux (fig. 28-31).

Parmi les kystes fusiformes, j'ai noté une seule fois un gros noyau quadrangulaire, et au-dessus deux petits centrosomes arrondis d'où partaient deux flagelles assez courts, dépassant le kyste (fig. 32).

Dans les formes *Crithidia*, c'est surtout chez les formes renflées, allongées ou géantes que l'on constate des phénomènes de division. Parasites, noyaux, blépharoplastes atteignent alors des dimensions anormales et présentent les mêmes particularités que celles indiquées ci-dessus. En plus, on observe un commencement de division du protoplasma, parfois assez marqué (fig. 29-33).

Nous figurons sur nos dessins quelques-unes de ces formes d'interprétation assez difficile ou formes de transition.

Etant donnée leur rareté, nous ne les avons pas mensurées, mais elles atteignent souvent des dimensions considérables.

Essais de culture.

Ils ont été tentés, mais en trop petit nombre, sur milieu intestinal de la punaise maupin, mis en pipettes, sur sérum d'ânon et sur milieu de Nicolle.

Dans les deux premiers milieux, on conservait les parasites quelques jours vivants et mobiles, et l'on observait vers la quarante-huitième heure de toutes petites formes en grain d'orge avec flagelle et assez mobiles.

En milieu de Nicolle, vingt-quatre heures après, j'ai retrouvé des petites formes libres, analogues à celles vues à l'intérieur des kystes fusiformes, avec gros noyau débordant le protoplasma à la coloration, centrosome volumineux pour leur taille et court flagelle, rappelant les formes leptomonas des cultures (fig. 64-65). Ces formes se voyaient aussi en amas, en rosaces, avec flagelles à l'extérieur. J'ai pu les suivre plusieurs jours. Les grosses formes, au contraire, se mettaient en boule ou devenaient granuleuses. Malheureusement toutes nos cultures étaient envahies rapidement par les bactéries, dont la présence est fréquente, sinon constante, dans le contenu intestinal des punaises maupin ; et, au bout de huit jours, les parasites étaient morts. Le temps nous a manqué à Maurice pour procéder à un grand nombre d'ensemencements.

II. — EXPÉRIENCES DE TRANSMISSION AUX MAMMIFÈRES. INFECTION SANGUINE DE LA SOURIS

Le *Conorhinus rubrofasciatus* s'attaquant à l'homme et aux animaux, se nourrissant de leur sang et présentant souvent des trypanosomides dans son intestin, il était indiqué de rechercher si ceux-ci n'étaient pas transmissibles aux animaux de laboratoire.

Nous avons donc institué à Maurice de nombreux essais de transmission par piqûres, injections sous-cutanées et intrapéritonéales, tenté les passages d'un animal à l'autre, cherché à établir si l'on se trouvait en présence d'un parasite du sang des mammifères.

Voici la marche et les résultats de ces différents essais.

A. — Essais de contamination par piqûres de l'insecte.

a) Chez le *Macacus cynomolgus* (1), dans tous les cas, les poils de l'animal étaient tondus ou rasés en divers endroits, notamment sur le dos, pour faciliter les piqûres. Un singe adulte immobilisé fut soumis à diverses reprises à des piqûres répétées de plusieurs réduves parasitées. Les piqûres, obtenues non sans peine, se sont montrées douloureuses au moment de la pénétration de la trompe, mais sans réaction inflammatoire concomitante. Aucune transmission de parasite ne fut obtenue.

b) Chez les *cobayes*. Douze cobayes, d'âge variant de un jour à plusieurs mois, furent exposés chaque nuit dans d'étroites corbeilles, entourées de mousseline à mailles fines solidement fixée, aux piqûres de très nombreuses réduves, provenant de tous les points du littoral et souvent renouvelées. Chaque matin les *Conorhinus* gonflés de sang à éclater étaient mis de côté. Certains cobayes n'ont été piqués qu'un jour, d'autres durant plusieurs semaines, mais toujours par un grand nombre d'insectes.

Chez cinq d'entre eux, l'expérience s'est poursuivie jusqu'à cinq mois et demi.

Les animaux réagissaient vivement à la piqûre, criaient ou s'affolaient. Certaines piqûres provoquaient des démangeaisons et les cobayes se grattaient alors avec acharnement. Il y eut ainsi quelques excoriations à l'endroit de la piqûre, provoquées par le grattage.

La piqûre ne laissait pas de traces, sauf parfois un amaigrissement passager.

Jamais nous n'avons observé de trypanosomes dans le sang périphérique.

Si nos cobayes ont été infectés à un moment donné de l'expérience, l'infection a dû être tout à fait passagère. Les femelles pleines, au nombre de 3, ont pu conduire à terme leur gestation et les petits ont tous vécu. Or, dans les trypanosomiases, au début de l'infection, l'avortement est souvent de règle ; nous l'observions fréquemment à Maurice chez les

(1) Cette espèce existe à l'état sauvage à Maurice.

génisses surrées. Il peut se faire que le cobaye n'ait pas été l'animal de choix, mais c'est celui que nous avions le plus facilement à notre disposition.

B. — Essais de contamination par injection.

a) Des essais de contamination par injection sous-cutanée ont porté sur le rat, le cobaye, le lapin, la mangouste et le *Macacus cynomolgus*. Ils ont tous été négatifs, malgré les fortes doses injectées de contenu intestinal des Punaises parasitées. Par injection *intrapéritonéale*, les résultats ont été négatifs chez la musaraigne, le cobaye, le lapin, le tanrec.

Chez un *Macacus cynomolgus*, dix jours après (1) une injection intrapéritonéale massive (injection du contenu intestinal de cinq Réduves parasitées), j'ai vu *une seule fois* un grand trypanosome à mouvements très rapides, progressant par ondulations dans le sang périphérique. J'ai pu le suivre trois heures au microscope, pensant qu'il s'agissait d'un parasite en voie de division. Mais à l'étalement du sang de cette même lame, après coloration, je n'ai plus rien retrouvé. En même temps, je notais une mononucléose accentuée, atteignant 71 p. 100 avec 29 p. 100 de grands mononucléaires et 1,5 p. 100 d'éosinophiles.

De nombreux examens par la suite furent constamment négatifs, ainsi que l'inoculation à un rat, à deux cobayes et une mangouste de un centimètre cube par animal du sang parasité du singe. Le singe, plusieurs mois après, était en excellente santé, n'ayant jamais donné signe de dépérissement.

b) *Inoculation intrapéritonéale au rat et à la souris*. Nous avons pensé qu'en nous adressant à des animaux plus petits : *rats*, *souris*, et qu'en les injectant à dose massive, on arriverait peut-être à vaincre leur résistance à l'infection. C'est en effet chez ces deux espèces que l'inoculation s'est montrée positive.

α. Chez le *rat*. Nous avons utilisé de gros rats adultes (*Mus rattus* et *decumanus*) tenus longtemps en observation au laboratoire et sûrement non infectés de *Tr. Lewisi*.

(1) Dans une note au *Bulletin de la Société médicale de l'Ile Maurice*, 3e série, n° 23, 1911, nous avons indiqué par erreur le passage du parasite dans le sang du *Macacus cynomolgus*, 30 heures après l'injection, au lieu de 10 jours.

Après injection du contenu total ou partiel de l'intestin du Réduvide parasité dans le péritoine du rat, on observait de quelques heures (3-4) à 24-30 heures, la présence du parasite vivant et mobile dans la sérosité péritonéale en même temps que d'impressionnants phénomènes de phagocytose.

Aux prises successives, on voyait les grands et moyens mononucléaires surtout, les polynucléaires en moins grand nombre, se gorger de grosses granulations noirâtres ou brunâtres, masquant leur noyau à l'état frais. Cette phagocytose intensive rappelait celle provoquée expérimentalement par l'injection de carmin (fig. 50).

Les parasites (*Crithidia* ou *Trypanosoma*) semblaient s'adapter à ce milieu ; mais à mesure que les particules noirâtres disparaissaient à l'intérieur des leucocytes, ils perdaient de leur mobilité ou se mettaient en boule. Vers la 24-30e heure, peu d'entre eux étaient vivants ; le plus grand nombre était déformé ou détruit. Ceux qui s'enkystaient perdaient parfois leur flagelle et prenaient la grosseur d'un globule sanguin avec phénomènes de division nucléaire se poursuivant à l'intérieur, si bien qu'on pouvait se demander si on ne se trouvait pas en présence d'un nouveau parasite du sang; mais des formes de transition et parfois la persistance d'un court flagelle montraient qu'on avait bien affaire au parasite initial.

Nous n'avons pas figuré ces formes enkystées sur nos dessins.

Pour n'y plus revenir, notons ici que ces mêmes phénomènes de phagocytose se sont montrés chez la *souris* avec peut-être plus d'intensité encore, car, à peine quelques heures après, nous retrouvions des *leucocytes mélanifères* dans la circulation sanguine. Le parasite de la Réduve a été retrouvé dans le péritoine comme chez le rat, mais jusqu'à la *58e heure*, le plus souvent déformé, en boule, élargi, en cerf-volant ou enkysté, présentant souvent deux noyaux, dont l'un la plupart du temps éclate en semis de granules.

Après coloration, les formes trypanosomiennes (fig. 52-58) ont mesuré, flagelle compris, 14 à 21 μ avec un noyau longitudinal, un protoplasma de dimension ordinaire et un blépharoplaste parfois très petit, arrondi, assez rapproché du noyau, et presque terminal. L'extrémité postérieure paraissait aiguë

ou arrondie. On voyait aussi des parasites à diverses étapes de leur évolution d'après les positions respectives de leur blépharoplaste et de leur noyau.

Quant aux *Crithidia*, moins nombreuses, elles se présentaient avec leurs caractères habituels et une extrémité postérieure élargie ou déformée. Il nous a semblé que ces formes étaient plus facilement altérables au suc péritonéal que les formes précédentes (fig. 58).

Dans le *sang périphérique*, chez le *rat adulte*, nous n'avons pas réussi à noter le passage des parasites, soit que ces formes aient été très rares ou qu'elles aient été détruites rapidement après leur passage dans la grande circulation.

Tous les rats adultes ont succombé par la suite à des causes indéterminées : captivité, maladies parasitaires, surtout ténias dont le foie était farci (kystes) et la lumière de l'intestin obstruée (adultes).

β. Chez la *souris* (*Mus musculus*). Nous citerons les résultats obtenus à la Réunion, à Cilaos (1), avec les parasites d'une Réduve du littoral dont l'intestin renfermait les mêmes formes qu'à Maurice (*Crithidia*, *Trypanosoma*).

Nous donnerons ensuite les résultats plus importants obtenus à Maurice, fin 1910.

Souris de Cilaos. — Elle reçut dans le péritoine le quart du contenu intestinal d'une Réduve, dilué dans du sérum physiologique. Les trypan. de la Punaise étaient très petits et très mobiles. Six heures après l'injection, les trypan. avaient déjà passé dans le sang. J'ai pu les suivre 25 à 30 heures. L'expérience s'est arrêtée là ; la souris ayant succombé à ce moment, aucun passage n'a pu être fait.

Colorés, les trypan. du sang atteignaient une longueur totale de 11 à 24 μ, le flagelle libre mesurant de 1,4 à 8,4. La largeur allait de 1,4 à 3,8 avec une moyenne de 2 μ.

Le blépharoplaste : 0,7 à 1,4 longueur; 0,5 à 0,7 épaisseur.

Le noyau : 1,4 à 2,8 longueur; 0,7 à 2,8 épaisseur.

La distance du centrosome au bord postérieur du noyau variait de 0,7 à 2,8 et du noyau à l'extrémité postérieure de 2 à 6 μ.

(1) Nous avons séjourné à Cilaos (Réunion), après notre départ de Maurice, de février à avril 1911. Notre expérience n'a pu avoir lieu qu'en mars-avril.

Cette extrémité elle-même était parfois très effilée et la membrane ondulante à peine ou largement plissée (fig. 59-63).

Après la mort de la souris, les parasites étaient déjà très rares ou en voie de dissolution.

Souris de Maurice. — Nous avons eu une difficulté extrême à nous procurer souris et jeunes rats et en nombre très restreint, en raison de la peste bubonique qui sévit à l'état endémique à Maurice, avec poussées périodiques épidémiques de fin août à mars chaque année. Néanmoins nos essais d'inoculation ont donné des résultats intéressants. Cinq souris injectées par la voie péritonéale ont présenté une infection très légère, légère ou sévère. Le flagellé de la Réduve a passé dans le sang 30 heures, 48 heures, 3 jours et 7 jours après l'inoculation.

Dans le sang, *à l'état frais*, il a pris la forme d'un trypan. pas très mobile au début, se déplaçant par grandes ondulations. Ce trypan., d'assez grandes dimensions (trois à quatre fois celles des petits trypan. de l'intestin de la Réduve, du péritoine du rat et du sang périphérique de la souris de Cilaos), présentait souvent une extrémité postérieure pointue ressemblant à un bec effilé. On le rencontrait en petit nombre, un pour 7,8 ou 50 champs de microscope (fig. 66, 68, 69, 70, 71, 73, 75, 76, 78, 80, 81).

L'infection sanguine de la souris, tantôt passagère, tantôt prolongée, a varié de un jour à huit jours pleins. Sauf dans un cas où la souris est morte accidentellement au cinquième jour de son infection, les parasites ont généralement disparu du sang au bout de quelques jours, après une période d'augmentation, puis de raréfaction. Mais quatre de ces souris infectées ont succombé de un jour à un mois après la disparition des parasites.

A noter que le trypan. augmentait de mobilité et de dimensions avec la durée de l'infection.

Les plus beaux échantillons ont été obtenus, soit avec le sang, soit avec les frottis d'organe (foie, reins), notamment chez la souris 5 (mort accidentelle au 5e jour de l'infection).

Nous avons reproduit de préférence sur la planche II (fig. 66 à 82) les trypan. du sang et des organes de cette souris 5. Les parasites, moins développés au début (30e à 50e heure), ont

augmenté de taille et de volume et atteint leur plein développement vers la 130e heure après l'inoculation.

Le parasite est remarquable par ses dimensions, par la courte distance séparant le noyau du centrosome, la position généralement transversale du noyau, enfin par la membrane ondulante vigoureusement marquée et remarquablement plissée.

La longueur totale a varié de 28 à 42 μ, flagelle compris.

Le flagelle libre de 4,2 à 9,8 μ est presque toujours terminé par un léger renflement à son extrémité libre. Nous n'insisterons pas sur ce renflement qui peut tenir à l'intensité ou aux dépôts du colorant, mais qu'on retrouve aussi sur quelques trypan. colorés de la souris de Cilaos, sans l'avoir jamais rencontré chez les parasites polymorphes de la Réduve, bien que nous nous soyons servis du même colorant.

Sa largeur, au niveau du noyau, de 1,4 à 4,2 μ, est en moyenne de 2,8 et dans sa plus grande largeur de 4,2.

Le *Blépharoplaste*, long de 0,4 à 1 μ, épais de 0,4 à 0,7, est tantôt linéaire, tantôt arrondi, en virgule, parfois triangulaire et en positions diverses par rapport au noyau, qu'il peut toucher presque. Il paraît entouré souvent d'une zone claire. Le flagelle qui en part présente parfois une sorte de fuseau, ouvert en éventail et regardant le blépharoplaste (fig. 70, 72, 79, 82).

Le *Noyau* a 1,4 à 2,8 μ de longueur sur 0,7 à 2,1 de largeur. Ovalaire ou rectangulaire, le plus souvent en position transversale, il occupe toute la largeur du parasite ou sa plus grande partie.

La position oblique, aperçue figures 73 et 78, est certainement une forme de transition.

Le noyau est granuleux ou compact, avec d'ordinaire dispersion des granules à la périphérie, mais on peut aussi les voir agglomérés au centre.

La distance du blépharoplaste au noyau oscille entre 1,4 et 3,5 μ, sauf dans les figures 67, 69, 73 où elle est inappréciable. Celle du blépharoplaste à l'extrémité postérieure varie de 2,8 à 9,6 et 14 μ dans les cas extrêmes ; celle du noyau va de 4,6 à 12,6 et 17 μ (cas extrêmes).

Le noyau est séparé de la face latérale correspondante par 0,7 à 1,4 μ.

La membrane ondulante présente une zone blanche longitudinale avec 4 ou 7 ondulations où le flagelle bordant ressort avec un grande netteté.

Quant à l'extrémité postérieure, allongée en bec acéré, elle peut s'aplatir, se renfler et se montrer plus ou moins obtuse (fig. 72, 74, 82).

Particularité remarquable, nous n'avons jamais réussi à voir des formes de division, même ébauchées, mais nous attirons l'attention sur les belles formes élargies (fig. 72, 77, 82) qui semblent proches de la division.

Nous nous contentons d'ajouter pour mémoire que des tentatives d'inoculation de ce parasite de la souris à de très jeunes *Mus rattus* ont échoué. Ces rats ont succombé assez rapidement après avoir présenté une infection sanguine à *Tr. Lewisi* qu'ils n'avaient pas au moment de l'inoculation. Mais le temps d'observation qui avait précédé cette inoculation avait été trop court.

III — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Après avoir étudié le parasite dans l'intestin du Réduvide et ses formes de passage dans le péritoine du rat et la circulation sanguine de la souris, plusieurs questions se posent :

1. Sommes-nous en présence d'un seul parasite ou de plusieurs ?
2. N'avons-nous pas eu affaire à de petits animaux sauvages, déjà parasités ?
3. Les Réduves n'hébergeaient-elles pas les trypan. d'un autre animal ?
4. S'agit-il d'un parasite déjà connu et comment le classer ?

1. — Au premier abord, le polymorphisme des formes flagellées de l'intestin de la Réduve est déconcertant, mais un fait demeure cependant : *c'est la constance de ces formes* chez les nombreux *Conorhinus rubrofasciatus* examinés par nous. Sur toutes nos lames, on retrouve les diverses formes crithidiennes, trypanosomiennes, arrondies ou fusiformes. Sans doute il y a parfois prédominance ou balancement du nombre de l'une ou de l'autre. On a donc pu saisir sur le fait un même parasite à diverses phases de son évolution.

Bien plus, en consultant nos planches, on retrouvera aisément entre les *Crithidia* et les trypan. des formes intermédiaires assez nombreuses. *On constate tous les degrés de la rétrogradation du blépharoplaste* qui devient postérieur au noyau.

Les trypan. de diverses dimensions que nous avons reproduits semblent attester l'évolution terminale des formes « crithidia » correspondantes.

2. — *Les petits animaux* (*rats et souris*) *n'avaient-ils pas de parasites préexistants dans leur sang*?

Une erreur de ce genre a failli se produire chez les tout jeunes rats qui ont présenté, au cours de l'expérience, une infection due au *Tr. Lewisi*. Pour les gros rats, il s'agissait de sujets en observation depuis plusieurs semaines au Laboratoire, examinés souvent et reconnus indemnes de tout parasite; là les observations sont valables.

Pour les souris, les examens aussi ont été négatifs avant toute expérience, et de plus, j'ajouterai que, tant à Maurice qu'à la Réunion, pendant trois années et demie passées dans ces deux pays, je n'ai jamais rencontré un seul trypanosome chez plusieurs centaines de sujets examinés qui m'ont servi : à la Réunion, comme contrôle des souches de vaccin anticharbonneux, et à Maurice pour l'étude de la peste, de la méningite cérébro-spinale et des pneumococcies.

Du reste, il est aisé de voir que trypanosomes et *Crithidia* du péritoine des gros rats et trypanosomes du sang de la souris de Cilaos se ressemblent; qu'ils rappellent d'une part les petits trypanosomes de l'intestin de la Réduve et de l'autre les formes *Crithidia* petites et moyennes qui en seraient l'ébauche. Chez les souris de Cilaos et chez les gros rats, on peut remarquer aussi que les parasites ont été un peu *altérés* par l'adaptation à des milieux nouveaux (sang, péritoine), sans perdre toutefois leurs caractères essentiels (position du noyau et du blépharoplaste).

Ce qui démontre bien qu'il y a de la part de l'animal inoculé action modificatrice, c'est le grand nombre de parasites détruits dans les deux cas dès les premières heures qui ont suivi l'inoculation dans le péritoine.

On peut nous objecter encore que l'identité des petits trypanosomes (intestin de la Réduve, du péritoine du gros rat et du

sang de la souris de Cilaos) n'est pas toujours complète. Le blépharoplaste, dans les deux derniers cas, n'est ni très gros, ni terminal; le noyau n'est pas toujours allongé; l'extrémité postérieure est le plus souvent effilée : tout cela est vrai; mais déjà pour certains trypanosomes de la punaise nous observons ces particularités. Entre les petits trypanosomes de l'insecte, à gros blépharoplaste terminal et globuleux, et ceux observés dans nos transmissions chez les petits animaux, on peut trouver toutes les formes intermédiaires.

Une expérience parle en faveur de l'unité du parasite, malgré son polymorphisme. En partant des œufs de Réduve, obtenus au laboratoire, nous avons eu des éclosions nombreuses. Jamais les larves, isolées et examinées de un jour à quelques semaines après la naissance, n'ont montré de parasites dans leur tube intestinal. *On peut affirmer que les éclosions récentes sont indemnes de tout parasite.*

Ces larves vierges sont mises à piquer la souris 5, en pleine poussée trypanosomique, pendant vingt-quatre heures. Retirées et isolées, elles sont gonflées de sang déjà hémolysé et couleur rouge cerise par transparence à travers le corps. En les retirant, quelques-unes éclatent comme des groseilles trop mûres et montrent, entre lame et lamelle, des flagellés, nageant dans le sang hémolysé et ressemblant à des formes en têtard; les jours suivants, les parasites s'allongent et augmentent de volume. Dix jours après, je retrouve des formes *leptomonas* rares, des *crithidia* variées, des ébauches de trypanosomes et des formes arrondies et fusiformes. Il s'agissait bien là des grands trypanosomes de la souris, revenus aux formes *crithidia* et à leur polymorphisme habituel dans l'estomac et l'intestin *d'une larve vierge de* Conorhinus, *habitat normal.*

Je n'ai pu suivre cette évolution heure par heure; mais ce que j'ai constaté est nettement *en faveur de l'unité du parasite.* Une étude plus approfondie mettra sans doute en évidence les anneaux qui peuvent manquer encore.

3. *Nos Réduves n'hébergeaient-elles pas les trypanosomes de quelque mammifère?*

Cette objection peut se soutenir, les Réduves mâles et femelles ayant été parfois capturées dans des parcs à bœufs, renfermant des animaux surrés et nous arrivant gorgés du

sang de ces animaux. Mais l'expérience suivante réduit à néant cette objection. Nous avons en effet soumis un cobaye surré (cobaye souche surra), à nombreux trypanosomes dans le sang périphérique, aux piqûres de larves de *Conorhinus* d'éclosion récente et *indemnes de tout parasite.*

Aux examens successifs des larves gorgées de sang, on ne retrouve plus de trypanosomes, mais seulement des débris de flagelles et des noyaux de parasites.

A la Réunion, où le surra n'existe pas jusqu'ici, les Réduvides des parcs à bœufs n'en hébergent pas moins des flagellés.

4. — *Comparaison du parasite de la Réduve avec les trypanosomes voisins.* — Si l'expérience précédente démontre bien qu'il s'agit d'un trypan. différent de celui du Surra, ce trypan. de la Réduve et ses formes « crithidia » n'ont pas moins des rapports, des points de ressemblance avec certains trypanosomes, notamment avec le *Lewisi* du rat et de la souris. Ce sont d'abord la petitesse du parasite dans l'intestin de la punaise et le péritoine du rat ainsi que sa forme tourmentée.

La ressemblance est surtout grande entre les petites formes trypanosomes, qui font partie de l'évolution du *Tr. Lewisi* chez la puce du rat (Swellengrebel et Strickland) et que Delanoë a retrouvées dans les cultures, et le trypan. de l'intestin de la Réduve : petite taille; gros blépharoplaste terminal.

A côté de certaines ressemblances entre les formes de notre flagellé chez la souris et les *Tr. Duttoni* et *Lewisi*, il y a de notables différences. La distance qui sépare le blépharoplaste du noyau chez les *Tr. Duttoni* et *Lewisi* du sang des rongeurs est constamment de 6-7 μ; *cette distance est deux à trois fois supérieure à celle qu'on observe chez notre parasite.*

Par la variété de ses formes, le parasite de la Réduve rappelle le polymorphisme si remarquable des *Leptomonas* des mouches du Congo et du Soudan, décrits par Roubaud; par les formes elles-mêmes, il rappelle encore mieux le *Tr. drosophilæ* de Chatton et Alilaire, réétudié récemment par Chatton et A. Leger et aussi le *Trypan. Grayi* Novy, tel que l'ont fait connaître Minchin et Roubaud. Nos formes peuvent être classées dans les Cystotrypanosomes de Roubaud (trypanosomes à reproduction kystique).

De même, beaucoup de nos formes : formes *Crithidia*, formes

rondes et ovalaires, rappellent les formes correspondantes de *Conorhinus megistus* infectés de *Schizotrypanum Cruzi*, à tel point qu'on les croirait parfois calquées les unes sur les autres.

De tout ce qui précède, malgré des concordances parfois curieuses avec les espèces précitées, en tenant compte des progrès récents de nos connaissances (Chatton et ses collaborateurs, Roubaud, etc.) sur les formes de passage des *Leptomonas* ou *Crithidia* aux *trypanosomes*; de l'existence de ces derniers chez des insectes non piqueurs ainsi que de leur polymorphisme, — nous sommes en droit de conclure que le parasite de notre Réduvide, *Conorhinus rubrofasciatus*, est un parasite nouveau, nettement différencié, caractérisé par son polymorphisme remarquable, par les dimensions de son blépharoplaste et ses rapports de position avec le noyau *chez le parasite adulte*; il y a lieu de classer, provisoirement du moins, sous un même nom, toutes les formes de l'intestin de la Réduve et celles des expériences de transmission au gros rat et aux souris.

Nous lui maintenons donc le nom de *Trypanosoma Boylei* (1) que nous lui avions déjà donné à Maurice.

Nous pensons que des études ultérieures permettront de préciser les points encore obscurs du développement de ce nouveau parasite. Pour les élucider, des envois pourront être faits en France, à l'Institut Pasteur. Des *Conorhinus* ont déjà pu y parvenir vivants ; malheureusement, ils n'étaient pas infectés (2).

IV. — BIOLOGIE DU CONORHINUS

Conorhinus rubrofasciatus est un bel insecte d'aspect brun ferrugineux, avec stries transversales couleur de rouille. Ces stries parallèles, semi-arquées et à concavité supérieure, parcourent l'abdomen. Elles sont recouvertes par les ailes et n'apparaissent libres que sur les bords.

(1) Ce nom est donné au parasite en souvenir de la fondation du *Bacteriological Laboratory* fin 1908, à Maurice, par le Gouverneur Cavendish Boyle, fondation réalisée avant tout avec l'important appui de la Station agronomique et les ressources financières des Planteurs Mauriciens.

(2) Ces envois sont dus à l'obligeance de Mlle Athénas, de M. le médecin-major Vincent, chef du laboratoire de bactériologie, et de M. Russel, de Bedfort. Nous tenons à leur adresser tous nos remerciements.

Très bombé après la succion, le corps est au contraire fortement déprimé et concave en dessus à l'état de vacuité.

L'hémiptère adulte mesure en moyenne 2 cm. 2 à 2 cm. 5. Il atteint 7 à 10 millimètres de largeur dans les deux sexes, qui sont facilement reconnaissables. La femelle, en effet, a son extrémité postérieure pointue et le mâle cette même extrémité arrondie.

Le mâle est aussi un peu plus petit que la femelle. Les antennes ont 8 à 9 millimètres de long. On rencontre assez fréquemment l'insecte à l'état de nymphes ou de larves dépourvues d'ailes.

Habitat. Mœurs (1). — Cet insecte se rencontre principalement dans les maisons habitées par la classe la plus pauvre de la population : engagés indiens, créoles de couleur, villages d'indiens libres habitant des paillotes ou des campements recouverts de paille sèche. On le trouve jusque dans les paillasses, bourrées de feuilles de maïs et d'herbes desséchées, ainsi que sous les cadres grossiers et en cordes de cocos, qui composent la literie. Il se réfugie aussi dans les fissures des parois de la case, la toiture en chaume, les cuisines, dans les étables rustiques, les parcs à bœufs, les porcheries, les écuries à cobayes. Il n'est pas rare de le rencontrer dans les vieilles maisons en bois aux cloisons et aux parquets disjoints, même lorsque ces maisons sont restées inhabitées un certain temps, un hivernage, par exemple.

Le *Conorhinus* fuit la lumière du jour et se dissimule dans les coins obscurs, où il reste immobile le jour pour ne piquer que la nuit et dans le plus grand silence. Au moindre bruit, à la moindre lumière, il s'enfuit et se cache. Cependant des plan-

(1) A *Maurice*, il s'étend à tout le littoral en général excessivement paludéen : Rivière-noire (Yémen, Case noyale, la Saline, Morne Brabant, Tamarin, Barachoa, Lamivoie) ; Médine, Plaines Meignien, Petite Rivière, Choisy, Trou d'eau douce, Pamplemousse (Beau Plan, Labourdonnais, The Mount), Poudre d'Or, Camp de Masque, Rivière claire, Savannah, Beauchamps, Queen Victoria, Union Vale, etc. Mais on le retrouve aussi, quoique plus rarement, à Coromandel, Rose Hill, Réduit, Quatre-Bornes et jusqu'à Curepipe (exceptionnel), c'est-à-dire de 50 à 500 mètres d'altitude.

A *la Réunion*. Son habitat est aussi de préférence le littoral. J'ai pu m'en procurer provenant de Saint-Louis, la Possession, Saint-Denis, le Chaudron, Champ-Borne.

Aux Seychelles, nous n'avons aucun renseignement bien précis sur les conditions de son habitat.

teurs ont pu capturer le soir des adultes, attirés par un éclairage éclatant, mais c'est là un fait exceptionnel.

Des indigènes m'ont affirmé qu'on le rencontrait quelquefois, à divers états de son développement ou à l'état adulte, sur les tiges de maïs planté aux alentours de la case, et se gorgeant des matériaux sucrés de la plante. De là, il pénétrerait, d'après eux, dans l'habitation. Je n'ai pu vérifier ce fait, mais il est curieux toutefois de constater la prédilection d'habitat de cet insecte pour les feuilles sèches du maïs servant à la confection des paillasses à Maurice, dans les groupements de travailleurs.

Ces Réduves, *à l'instar du* Reduvius personatus *européen*, sucent aussi les punaises des lits (*Acanthia lectularia*) fréquentes dans les mêmes habitations. Elles les transpercent d'un seul coup de leur trompe courte et robuste et les vident en un clin d'œil.

J'ai même essayé quelque temps avec succès de nourrir nos Réduves en leur donnant des punaises de lit. Des indigènes les conservaient parfois en leur donnant de la bouse de vache desséchée comme nourriture. Mais la nourriture de choix est certainement le sang de l'homme et des animaux, ainsi qu'on le constate par la dissection de l'insecte.

A certaines périodes, la *punaise Maupin* dégage une odeur aigrelette et pénétrante de vinaigre ou d'acide acétique, et non pas une odeur nauséabonde comme l'indiquent les indigènes.

J'ai observé fréquemment la mue de cette Réduve, qui est une véritable crise où je l'ai vue succomber souvent. En cet état, elle devient rougeâtre et reste inerte de longues heures.

Nutrition. Excrétion. — Les adultes des deux sexes et les nymphes capturées ont toujours du sang dans l'estomac en plus ou moins grande abondance, hémolysé ou en masse compacte ; nous l'avons déjà noté.

Quand on met les Réduves piquer un animal, on remarque que les nymphes à corselet étroit se gonflent de sang avec plus d'avidité que les adultes et sont gonflées à éclater.

Grosses nymphes et adultes, surtout les femelles, peuvent absorber environ un centimètre cube de sang et au delà. Nous en avons vu rester dures comme du bois après un seul repas, ne plus vouloir piquer et mourir au bout de quinze jours. Ils

peuvent ainsi rester à jeun deux à quatre semaines ; de là, la possibilité de les recevoir vivants en Europe, mais habituellement *ces Réduves ont un besoin impérieux de piquer tous les quatre ou cinq jours*, surtout les femelles lorsqu'elles pondent. Les intervalles entre les repas peuvent varier de trois à dix jours et plus. Le sang dans l'estomac s'hémolyse assez vite en deux à trois jours ou reste dur, compact un temps indéfini, les insectes pouvant succomber sans parvenir à digérer cette masse à consistance de mastic. Nos constatations ont souvent concordé ici avec celles de Chagas pour *C. megistus*.

Quant aux nymphes, elles digèrent plus lentement que les adultes et piquent moins souvent, tous les sept à huit jours ou même tous les quinze jours.

Le Réduvide émet spontanément par l'anus deux sortes de déjections : l'une est un liquide jaunâtre qui se dessèche rapidement à l'air; l'autre, une substance noirâtre, à dessiccation plus lente, qui poisse les doigts comme le ferait de l'encre noire épaissie. Ces deux sortes de déjections ont été recueillies soit par émission naturelle, soit par pression sur le ventre de l'insecte et soumises à une analyse chimique, avec la collaboration de MM. Bonâme et de Sornay (1), auxquels nous adressons ici nos très cordiaux remerciements.

Le liquide jaunâtre examiné au microscope ne laisse voir que des cristaux d'urate de soude. Sa réaction est acide. A l'analyse il donne (2) :

Résidu après calcination.	traces.
Acide urique, p. 100	36,93 (dosé sur 0 gr. 058)
Urée, p. 100	3,04 (dosé sur 0 gr. 084)
Azote total, p. 100	21,24 (dosé sur 0 gr. 050)
Eau, p. 100	12,72 (dosé sur 0 gr. 055)

L'acide urique a été dosé suivant la méthode Denigès; l'urée par la méthode de l'hypobromite à l'uréomètre à eau d'Yvon, l'azote par la méthode de Kjeldahl.

En dehors de l'urée et des urates qui constituent près de 50 p. 100 du produit jaunâtre, il s'y trouve d'autres substances

(1) Directeur et sous-directeur de la station agronomique du Réduit, à l'Ile Maurice.
(2) MM. Bonâme et de Sornay.

azotées qui n'ont pu être déterminées. On pourrait établir sa composition centésimale de la façon suivante :

Eau	12,72
Urée	3,04
Urate de soude	41,73
Azote combiné	7,53
Matières indéterminées	34,98
	100.00

Les déjections noires ont une réaction neutre, ne montrent pas trace d'acide urique et laissent un résidu ferrugineux. Au microscope on y reconnaît des pigments colorés animés de mouvements browniens. La présence d'une matière minérale abondante à teneur en fer élevée, permet de penser à des résidus de la digestion du sang, dont les punaises se nourrissent. L'analyse n'a pu se faire que sur le mélange des déjections recueillies dans les verres où avaient séjourné les punaises. Ce mélange est franchement acide. 0 gr. 801 du mélange ont donné :

Eau	10.23 p. 100
Matières minérales	12.66 —
Azote total	21.50 —

Les matières minérales ont fourni la composition suivante :

Chlorure de sodium	47,36
Sesqui-oxyde de fer	42,10
Chaux, acide phosphorique, soufre et indéterminé	10.54
	100,00

Reproduction. — Frappé du grand nombre d'œufs trouvés dans les récipients où l'on nous apportait les Réduves, ainsi qu'aux autopsies où ils recouvraient et masquaient parfois l'intestin, nous avons conservé et alimenté des femelles, afin de suivre les pontes, avec des survies allant de quinze à quatre-vingt-trois jours.

Les pontes sont successives et peuvent donner en une fois 25, 30 et 40 œufs. Ce dernier chiffre est rare. Avec des Réduves isolées, j'ai pu recueillir 66, 112 et 182 œufs par insecte.

Souvent, après une ponte excessive, la Réduve refuse de piquer et semble périr d'épuisement.

D'août à fin décembre 1910, les quelques centaines de

Réduves que j'ai pu me procurer ont pondu 13.000 œufs environ.

Il y avait parmi mes Réduves une proportion de un mâle pour deux femelles. La plupart de ces œufs ont éclos au Laboratoire du Réduit.

OEufs. — Ils mesurent environ 2 millimètres de long sur 1 de large, sont ovoïdes et très blancs au moment de la ponte; mais ils se foncent rapidement à l'air et prennent une teinte vieil ivoire (action des oxydases). Les jours suivants, ils deviennent rougeâtres à la veille de l'éclosion et cette dernière peut ne pas se produire à cette phase de leur évolution. Le temps de l'éclosion varie avec la température. En juillet-août, à Maurice (saison fraîche), les éclosions étaient retardées ou ne se faisaient pas. De septembre à décembre, elles évoluaient avec une grande rapidité, parfois en huit-dix jours.

La *Larve*, au sortir de l'œuf, est de coloration rouge vif, de dimension supérieure à l'œuf et parfaitement conformée. Elle recherche aussitôt les endroits obscurs et peut rester quinze-vingt jours sans manger. Ces larves subissent déjà des mues à cette période. Mises sur un petit animal (souris, rat, cobaye), elles le piquent aussitôt, se gorgent de sang et se laissent tomber dès qu'on les touche.

Il y a, à cette période, une certaine analogie entre elles et les jeunes larves de tiques. Dans leur estomac, le sang s'hémolyse avec une extrême rapidité (grande puissance des ferments digestifs). Les larves ne tardent pas à montrer par transparence une zone rouge cerise, une zone noirâtre et une zone blanc jaunâtre, correspondant aux trois zones décrites chez l'adulte (estomac, intestin, rectum), et déjà parfaitement délimitées.

Placées sur un jeune oiseau tombé du nid et près de mourir, elles ont cherché à s'enfuir et sont mortes sur le cadavre sans avoir piqué.

Dans une autre expérience, mises au nombre de plusieurs centaines sur une souris, elles ont entraîné sa mort en moins de vingt-quatre heures. J'ai pu en conserver pendant quatre mois et les voir, après des mues nombreuses, atteindre la dimension d'une forte lentille. Elles sont alors de teinte foncée et brunâtre. En les mettant dans la main fermée (nymphes âgées de quatre mois), elles se gonflent rapidement de sang, sans qu'on

perçoive la piqûre et sans que cette dernière laisse de traces; cela doit tenir à l'extrême ténuité de leur trompe et peut expliquer ce fait que les Indigènes sont souvent piqués par des larves et des nymphes sans rien ressentir.

J'ai dit plus haut que, lorsqu'elles piquent une souris infectée avec le parasite intestinal de la Réduve, on retrouve ce parasite dans le sang hémolysé sous forme de tétard ou de *leptomonas*.

*
* *

La possibilité d'inoculation aux petits rongeurs du trypanosomide du *Conorhinus rubrofasciatus*, les analogies de son évolution avec celle du *Schizotrypanum Cruzi*, parasite humain, amènent à la supposition que le *Tr. Boylei* est peut-être, lui aussi, l'agent d'une maladie humaine, inoculée par le *Conorhinus*. Voici quelques faits en faveur de cette hypothèse :

Les piqûres de notre Réduve chez l'homme sont loin d'être toujours inoffensives. Le Dr Tennant (1) a cité le cas intéressant d'une de ses malades qui a présenté fièvre et œdèmes. Dans d'autres observations non publiées, on a observé des lymphangites assez graves. Parfois la fièvre a duré plus de quinze jours, sans céder à la quinine (2).

J'ai vu à Lamivoie (Rivière Noire, Maurice) des petits enfants atteints d'anémie prononcée, avec bouffissure intermittente de la face et des membres inférieurs, rate énorme, accès de fièvre irrégulière, tous symptômes faisant songer à une trypanosomiase : à aucun prix, les parents n'ont consenti à des prélèvements de sang, même au doigt.

J'ai enfin signalé sous ce titre « un cas suspect à retenir (3) », l'observation d'un homme jeune, ayant succombé en moins d'un an et demi à une fièvre irrégulière. Les examens pratiqués au laboratoire ont permis d'éliminer toute affection pyogène, la tuberculose, la syphilis, l'ankylostomiase, le paludisme, la fièvre typhoïde, la grippe, la fièvre de Malte, la fièvre ami-

(1) *Bull. Soc. médic. île Maurice*, 29e année, n° 24.

(2) J'ai rencontré une fois, dans le contenu intestinal de cette punaise, des bacilles ovoïdes, voisins du b. de Yersin. Cet hémiptère pourrait accidentellement transmettre la peste à Maurice.

(3) *Bull. Soc. médic. Ile Maurice*, 1911, n° 23.

bienne, le kala-azar (cultures et inoculation au chien négatives). Les leucocytes, à *mononucléaires prédominants*, tombèrent progressivement de quelques milliers à 600 par millimètre cube.

Comme cet homme présentait, en dehors de la fièvre, de l'hypertrophie de la rate, des œdèmes fugaces, de l'anémie progressive et des diarrhées intermittentes, l'hypothèse d'une trypanosomiase n'est pas à rejeter. Une enquête, faite à la Rivière-Noire, m'a de plus appris que le malade, chasseur intrépide, couchait souvent dans une case infestée de *Conorhinus rubrofasciatus*.

Nous espérons que ces quelques données conduiront quelque chercheur, plus heureux que nous, à découvrir une trypanosomiase humaine.

En terminant notre étude, malheureusement incomplète, sur le parasite polymorphe du *Conorhinus rubrofasciatus* et sa transmission dans le péritoine du rat et le sang de la souris, nous remercions bien vivement MM. Mesnil et Chatton des excellents conseils qu'ils nous ont donnés sur les documents rapportés de Maurice ainsi que de leurs critiques judicieuses dont nous avons essayé de tirer parti.

EXPLICATION DES PLANCHES XIX et XX

Planche XIX.

Fig. 1-6 et 15. . — Petites formes *Crithidia*.
Fig. 7-13. . . . — Formes moyennes.
Fig. 14-16 et 22. — Grandes formes.
Fig. 24-28 . . . — Formes trypanosomes du réduvide.
Fig. 27-33. . . . — Formes diverses en voie de division ou anormales.

Planche XX.

Fig. 34-43. — Formes arrondies.
Fig. 46-49. — Kystes fusiformes.
Fig. 44-45. — Passage aux kystes.
Fig. 50 . . — Phagocyte chargé de pigment brun.
Fig. 51-58. — Formes du péritoine du rat.
Fig. 59-63. — Trypanosomes du sang de la souris de Cilaos.
Fig. 64-65. — Formes de culture.
Fig. 66-82. — Trypanosomes du sang de la souris de Maurice.

RECHERCHES SUR LE FERMENT MANNITIQUE

par E. DUBOURG

On connaît un certain nombre de microbes qui attaquent la mannite avec formation d'alcool, d'acides fixes et volatils ; mais ce sont tous des anaérobies stricts ; et du reste, il n'a pas encore été démontré que ces mêmes microbes, qui consomment cet alcool polyvalent, soient capables d'en former aux dépens du lévulose.

D'autre part, on a trouvé, dans des vins malades (1), des ferments donnant naissance à de la mannite ; aucun d'eux n'a été signalé comme la détruisant dans la suite de son évolution.

M. Laborde (2) cependant ayant rencontré dans des vins tournés, des ferments mannitiques, alors que ces vins ne contenaient pas de mannite, en a conclu que *la mannite peut être attaquée, après disparition du lévulose, et même disparaître complètement à son tour.*

Depuis longtemps la question m'avait paru assez digne d'intérêt pour que j'aie cru devoir vérifier, *par des expériences directes*, si la mannite est susceptible de disparaître dans les vins et aussi dans les liquides artificiels, sous l'influence des ferments mannitiques, mais j'ai borné mon étude à celui que nous avons étudié M. Gayon et moi.

Nous avons montré que ce ferment, provenant de vins malades, ne pouvait être assimilé à ceux de la tourne, qui produisent un mélange d'acide acétique et d'acide propionique avec disparition plus ou moins complète de la crème de tartre, ainsi qu'on peut le constater dans les vins tournés typiques.

Dans ces mêmes vins, les dépôts laissent apparaître au microscope des filaments qui s'enchevêtrent plus ou moins à mesure que la maladie se prolonge (3).

(1) GAYON et DUBOURG, *Ces Annales* : 1894, 1901, 1904. — LABORDE, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 1898 ; *Revue de Viticulture*, 1901. — MAZÉ et PERRIER, *Ces Annales*, 1903. — MAZÉ et PACOTTET, *Ces Annales*, 1904. — KAYSER et MANCEAU, *Les Ferments de la graisse des vins*. Épernay, 1909.

(2) LABORDE, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 1904.

(3) PASTEUR, *Études sur le vin*, 1866. — U. GAYON, *Revue de Viticulture*, 1899.

Le 11 novembre 1903, j'institue l'expérience suivante avec deux vins de l'année mis en bouteilles.

1° Vin de Médoc pasteurisé à 60 degrés (1er témoin).
2° Même vin non chauffé (2e témoin).
3° Même vin pasteurisé, ensemencé avec le ferment mannitique.
4° Même vin pasteurisé, additionné de lévulose (témoin).
5° Le même vin ensemencé.
6° Vin de Saint-Émilion, pasteurisé (1er témoin).
7° Même vin non chauffé (2e témoin).
8° Même vin pasteurisé, ensemencé.

Ces divers échantillons solidement bouchés sont placés dans une armoire du laboratoire.

Un premier essai est fait en juillet 1905.

Examen microscopique.

1. Ni levures, ni microbes.
2. Levures vieilles, nombreux microbes.
3. Nombreux microbes agglomérés, pas de filaments.
4. Quelques microbes jaunâtres.
5. Nombreux microbes agglomérés; pas de filaments.
6. Quelques levures vieilles, pas de microbes.
7. Levures vieilles, nombreux microbes.
8. Quelques rares levures, microbes agglomérés; pas de filaments.

ANALYSE CHIMIQUE

	ACIDITÉ (1) fixe.	ACIDITÉ volatile.	SUCRE	MANNITE	CRÈME de tartre.
1	2,97	0,80	8,70	0 »	2,88
2	3,86	1,24	0 »	0 :	2,18
3	3,74	1,69	0 »	2,65	2,82
4	2,95	0,78	15,86 (2)	0 »	2,78
5	4,45	2,35	0 »	7,62	2,81
6	3,23	0,43	21,60	0 »	2,55
7	3,86	0,92	0 »	0 »	2,22
8	4,92	2,59	0 »	6,65	2,52

(1) Les acidités sont calculées en acide sulfurique.
(2) Le vin contenait déjà 8 gr. 70 de sucre, la différence provient du lévulose ajouté.
Tous les éléments sont exprimés en grammes par litre.

En comparant les témoins aux vins ensemencés, on arrive aux conclusions suivantes :

1° Les témoins non chauffés 2 et 7 sont altérés, avec diminution de la crème de tartre, sans formation apparente de mannite :

2° Le n° 4, lévulosé et ensemencé avec le ferment mannitique, a fourni des doses de mannite, d'acidité fixe et volatile normales, sans attaque de la crème de tartre.

J'ajoute que l'acidité volatile était constituée par de l'acide acétique seul. Enfin, le microscope n'a révélé que des microbes agglomérés, sans filaments.

Des constatations semblables s'appliquent au n° 8 comparé avec ses témoins 6 et 7.

Ces différentes déterminations ont été faites environ vingt-mois après l'ensemencement.

Le 25 novembre 1903, je mets en expérience une seconde série de vins comme suit :

1° Vin de Léognan; pasteurisé (témoin).
2° Même vin, pasteurisé, ensemencé.
3° Même vin additionné de mannite; pasteurisé (témoin).
4° Le même, ensemencé.

ANALYSE DE JUILLET 1905

	ACIDITÉ fixe.	ACIDITÉ volatile.	SUCRE	MANNITE	CRÈME de tartre.
1	3.02	0.61	7,70	0 »	2,45
2	3.78	1.42	0 »	2.15	2,48
3	3,00	0.57	7,75	8.60	2,42
4	3.67	1.48	0 »	10,85	2,47

Ici la mannite et la crème de tartre n'ont pas été atteintes après vingt mois. Par suite de la disparition du réducteur, il y a eu, au contraire, apparition de mannite au n° 2 et formation supplémentaire du même composé au n° 4, avec augmentation corrélative d'acides fixes et volatils dans les deux échantillons.

En janvier 1904, j'introduis dans des bouteilles de l'eau de levure à 15 p. 100 très légèrement sucrée avec de l'inverti.

1° Eau de levure, additionnée de mannite (témoin).
2° Même milieu ensemencé.
3° Eau de levure, additionnée de crème de tartre (témoin).
4° Même milieu ensemencé.
5° Eau de levure lévulosée (témoin).
6° Même milieu, ensemencé.

Toutes les bouteilles sont stérilisées, l'ensemencement a lieu le lendemain.

L'essai est fait en août 1905.

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

1, 3, 5. Pas de microbes.
2 et 4. Microbes agglomérés, peu nombreux.
6. Nombreux microbes agglomérés.

ANALYSE CHIMIQUE

	ACIDITÉ fixe.	ACIDITÉ volatile.	SUCRE	MANNITE	CRÈME de tartre.
1.	0,48	Traces.	3,02	10,00	»
2.	0,71	0,36	0 »	10,85	»
3.	1,30	Traces.	4,85	0 »	2,80
4.	1,72	0,55	0 »	Traces.	2,84
5.	0,47	Traces.	10,55	0 »	»
6.	1,51	1,14	0 »	6,48	»

On trouve la mannite intacte en 2, avec une petite quantité supplémentaire ; il y en a également des traces en 4 ; elle est à dose normale dans le n° 6 ; la crème de tartre se retrouve en entier dans le n° 4. Le microbe a cultivé en 2, 4 et 6, puisqu'il y eut en 2 et 4 disparition du sucre avec formation d'acides fixes et volatils dont la proportion devient plus importante en 6.

J'avais préparé un certain nombre d'échantillons de chacun des types afin de pouvoir prolonger les expériences. J'ai procédé à de nouveaux essais en avril 1908 et mai 1911, soit environ cinq et huit ans après la mise en œuvre.

A ces deux époques, j'ai renouvelé mes observations et analyses sur tous les échantillons déjà examinés en 1905. Les conclusions que je pourrais tirer de ces déterminations seraient absolument identiques aux précédentes ; mais, tandis qu'après vingt mois j'ai pu rajeunir toutes mes cultures, j'ai échoué avec les vins en 1908 et les milieux artificiels en 1911 ; ces derniers m'avaient donné des résultats positifs en 1908.

Dans ces conditions, je ne saurais dire à quel moment l'évolution du microbe a été arrêtée. Comme la mannite, même en 1911, n'avait pas diminué, il faut admettre que le microbe ne l'a pas attaquée sa vie durant.

On arrive à des résultats de même nature avec des cultures aérobies en matras Pasteur.

Le 20 mai 1908, j'ensemence 500 cent. cubes d'eau de levure stérilisée dans des matras de 1 litre, afin de laisser une couche d'air au-dessus de la culture.

Après six semaines d'étuve à 35 degrés, j'ai fait un premier essai. A ce moment, j'ai placé les matras dans une armoire et j'ai attendu jusqu'en juin 1911.

1° Culture avec 19 gr. 20 de lévulose par litre.
2° Culture avec 10 gr. 10 de lévulose par litre.
3° Culture avec 11 gr. 70 de sucre interverti.
4° Culture avec 5 gr. 15 de sucre interverti.

Le microscope révèle de nombreux microbes dans les quatre cultures.

ANALYSE CHIMIQUE (1)

	ACIDITÉ FIXE		ACIDITÉ VOLATILE		MANNITE	
	Juillet 1908.	Juin 1911.	Juillet 1908.	Juin 1911.	Juillet 1908	Juin 1911.
1	2,39 (a)	2,25	1,85	1,98	11,86	11,90
2	1,42	1,35	1,12	1,24	5,71	5,74
3	1,66	1,51	1,21	1,37	3,57	3,60
4	1,02	0,93	0,67	0,78	1,27	1,22

(a) Aux acides fixes formés viennent s'ajouter ceux qui sont apportés par l'eau de levure.

(1) Le sucre avait disparu dans les quatre cultures dès juillet 1908.

L'expérience a duré trois ans; les microbes des quatre cultures ont pu être rajeunis, et la mannite, on le voit, se retrouve en entier avec de faibles variations dues à la méthode de dosage. Il y a eu une légère diminution de l'acidité fixe avec augmentation corrélative de l'acidité volatile; c'est d'observation constante dans les fermentations mannitiques prolongées.

Avec le ferment mannitique que j'étudie ici, la mannite ne disparaît donc pas quand il ne reste plus de sucre dans la culture, que ce soit en vie anaérobie ou en vie aérobie.

Que cette hexite puisse disparaître dans les vins, cela ne saurait surprendre. Comme l'ont indiqué MM. Mazé et Pacottet (1), les maladies des vins sont dues, sans aucun doute, à des associations microbiennes. Certains ferments attaquent la crème de tartre, d'autres la glycérine; il en est qui donnent naissance à de la mannite, peut-être en existe-t-il qui la consomment. Qu'un même microbe puisse à la fois former et détruire un même composé chimique, rien ne paraît s'y opposer *a priori*, puisqu'on en connaît déjà; mais ce sont surtout des moisissures ou des bactéries essentiellement aérobies, les ferments acétiques, par exemple. Toutefois, il devient nécessaire désormais de démontrer, par des expériences directes, la disparition de la mannite, avec d'autres ferments mannitiques que celui que je viens d'étudier.

J'indique en terminant que nous avons retrouvé avec M. Gayon de la mannite dans un vin de 1878 examiné en 1899; et je tiens de M. Gayon qu'il a eu tout récemment l'occasion d'en vérifier la présence dans un vin de 1892.

Nous venons de voir qu'une culture de notre ferment peut être rajeunie après trois ans dans les vins et après cinq ans en milieux artificiels. On sait d'autre part que, dans ces mêmes milieux, ce ferment peut consommer des quantités relativement élevées de divers sucres. Dans les essais comparatifs de fermentations mannitiques, il a toujours été reconnu comme le plus actif. Ces observations m'ont suggéré la pensée de faire, à mon tour, une étude comparée avec le ferment Bulgare et cinq autres microbes lactiques que je dois à la complaisance de MM. Kayser

(1) Ces *Annales*, *loc. cit.*

et Mazé. A ma demande, ces savants ont choisi parmi les ferments les plus actifs de leur collection. Je suis heureux de les remercier ici.

Pour mesurer l'activité d'un microbe, le moyen le plus simple consiste à le cultiver dans des milieux appropriés, en présence de sucres divers, et à déterminer les quantités de sucre consommé par le microorganisme. On peut dresser ainsi des tableaux comparatifs.

Dans ceux qui suivent, le ferment mannitique est désigné par le symbole M^t, le Bulgare par la lettre B, les deux ferments de Kayser par K^1 et K^2, enfin ceux de Mazé par $M^1 M^2 M^3$.

	M	B	K^1	K^2	M^1	M^2	M^3
Galactose	34,60	31,10	23,40	26,30	13,45	14,55	12,32
Glucose	36,80	30,30	27,20	26,80	19,30	21,60	23,20
Mannose	33,40	26,30	18.35	19,42	24,00	22,30	24,50
Sucre interverti	37,90	29,20	28,10	29,90	25,30	27,10	26,15
Lactose	27,90	28,40	26.10	25.15	25,10	23,40	25,10
Maltose	23,00	0 (1)	19,00	13,15	0 »	0 »	14,10
Saccharose	29,40	0 »	28,75	29,30	27,00	26,50	23,10
Raffinose.	22,90	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »
Arabinose	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »
Xylose	18,90	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »

(1) Cette expérience confirme celles de M. Gabriel Bertrand. — Ces *Annales*, 1909.

En milieu maintenu neutre par addition de carbonate de chaux, on trouve les chiffres suivants :

	M^t	B	K^1	K^2	M^1	M^2	M^3
Galactose	65,90	58,30	45,15	42,30	55.20	54,10	51,90
Glucose	69,60	54,40	39,40	45,90	49,75	51,15	52,10
Mannose	58,60	53,30	48,52	49,90	51,60	55,80	53,10
Inverti	107,90	58.40	62.80	70,70	77,90	77,85	73,15
Lactose	51,80	62,60	31,60	42,50	33,10	53,00	46,15
Maltose	55,65	0 »	39,70	41,60	0 »	0 »	45,55
Saccharose.	65,75	0 »	63,80	51,60	57,60	58,80	49,10
Raffinose.	72,80	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »
Arabinose	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »	0 »
Xylose	55,70	0 »	0 »	0 »	0 »	0 «	0 »

Les analyses ont été faites après cinq semaines d'étuve à

35 degrés ; le milieu était constitué par de l'eau de levure à 15 p. 100. Les chiffres des tableaux représentent les quantités de sucre disparu par litre.

On peut fixer une moyenne en laissant de côté les pentoses et en considérant d'une part les hexoses et d'autre part les saccharides.

1° **Sans carbonate de chaux.**

	M^t	B	K^1	K^2	M^1	M^2	M^3
Hexoses	33,17	29,97	24,26	25,10	20,74	21,34	21,54
Saccharides	25.72	6.35	18.31	16,87	13.02	12.47	15.57

2° **Avec carbonate de chaux.**

	M^t	B	K^1	K^2	M^1	M^2	M^3
Hexoses	75.00	58.60	48.97	52.27	58,56	59,67	54.34
Saccharides	61.50	15.65	33.88	34.72	22,67	27.75	37,71

On voit, par ces divers résultats, que le ferment mannitique tient le premier rang par son activité. Toutefois, il est bon de remarquer, qu'avec d'autres milieux, les rangs occupés par chacun de ces microbes pourraient se trouver modifiés.

On peut expliquer l'énergie destructive du ferment mannitique par ce fait qu'il ne donne pas naissance seulement à des acides, comme les microbes lactiques proprement dits, mais aussi à d'autres produits de nature diverse dont les actions nocives ne se surajoutent pas.

Cette activité du ferment mannitique apparaît encore en présence de certains composés arsenicaux. Ce microbe se cultive très bien dans des milieux contenant 5 p. 100 d'arséniate de soude cristallisé, 1,5 p. 100 d'arsénite de potasse, 8 p. 100 de cacodylate de soude et 7 p. 100 de méthylarsinate di-sodique. Les autres ferments lactiques étudiés ici supportent avec peine une dose dix fois moindre. Et l'on observe, avec le ferment mannitique, un phénomène analogue à celui qui a été signalé

par M. Trillat dans ses études si intéressantes (1) : La quantité de sucre disparu est plus considérable, dans les cultures contenant 1 p. 1000 d'arséniate, que dans les milieux témoins.

En résumé, le ferment mannitique étudié dans ce mémoire n'attaque pas la mannite qu'il a formée, pas plus du reste que la crème de tartre, quand il est cultivé dans les vins ou des milieux artificiels qui en contiennent.

La vitalité de ce microbe est considérable ; on peut expliquer ainsi l'apparition de la mannite, dans les vins d'une même région, à des intervalles très espacés. Le développement de ce germe n'est favorisé en effet que dans les années où il y a à la fois, au moment des vendanges, excès de température et faible acidité des moûts. Ces deux circonstances simultanées nécessaires peuvent ne se rencontrer qu'à des périodes éloignées pouvant dépasser souvent plus de dix années.

Cette vitalité est très supérieure à celle des ferments lactiques ordinaires qui ne résistent pas plus de deux ou trois mois en culture, quand on ne prend pas la précaution d'ajouter du carbonate de chaux. Le ferment Bulgare, particulièrement sensible aux acides, doit être rajeuni au moins chaque quinzaine.

Enfin l'activité du ferment mannitique s'étend à tous les sucres à molécule définie, le tréhalose et l'arabinose exceptés (2) : seul, il attaque le xylose. Néanmoins, il est impuissant à faire fermenter la mannite ainsi que la dulcite et la sorbite (3).

M. Gabriel Bertrand a établi (4) que le ferment Bulgare, pourtant très actif vis-à-vis d'un certain nombre de sucres, n'attaque également aucune hexite.

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 1909 à 1912, *passim*.
(2) Gayon et Dubourg, *loc. cit.*
(3) *Ibid.*
(4) G. Bertrand, *loc. cit.*

RECHERCHES
SUR L'HYDROLYSE COMPARÉE DU SACCHAROSE
PAR DIVERS ACIDES
EN PRÉSENCE DE LA SUCRASE D'ASPERGILLUS NIGER,

par M. Gabriel BERTRAND et M. et Mme ROSENBLATT.

Toutes les expériences que nous avons publiées récemment sur l'hydrolyse comparée du saccharose par divers acides en présence de la sucrase ont été faites avec une préparation retirée de la levure (1). Or, il était possible que la partie du système diastasique qui, dans la théorie émise par l'un de nous, représente la complémentaire activante, eût des caractères un peu différents selon son origine et se comportât, dès lors, d'une manière non identique avec la série des acides.

Afin de voir quelle part de vérité était contenue dans cette hypothèse et, au besoin, en tenir compte, nous avons, à la suite de nos recherches sur la sucrase de levure, examiné comparativement la sucrase d'*Aspergillus niger*.

Ces nouvelles recherches ont été conduites exactement de la même manière que les précédentes, sauf, bien entendu, en ce qui concerne la préparation de la sucrase.

Nous sommes parvenus à obtenir avec l'*Aspergillus* une solution diastasique d'activité sensiblement constante pendant toute la durée des recherches, non pas en utilisant, comme on le fait d'habitude, le liquide de plasmolyse du champignon frais, liquide assez difficile à conserver, mais en préparant d'abord une poudre mycélienne, puis en faisant macérer chaque fois un poids déterminé de cette poudre dans un certain volume d'eau.

Des conidies d'*Aspergillus* ont été largement ensemencées sur du milieu Raulin contenu dans des matras. Après trois jours, à la température de 37 degrés, les mycéliums bien développés ont commencé à se recouvrir de

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 321, 1912.

conidies, on les a extraits des matras, lavés à deux reprises par immersion de quelques minutes dans l'eau distillée, pressés fortement à la main entre des feuilles de papier à filtre et mis à sécher dans le vide, sur l'acide sulfurique, à + 35 degrés. Le lendemain, les mycéliums secs ont été réduits en poudre fine à l'aide d'un moulin à café turc; la poudre, aussitôt enfermée dans un flacon bien bouché, a été conservée à l'abri de la lumière.

Chaque matras de culture, du volume d'un litre et demi et renfermant 250 cent. cubes de milieu nutritif, a fourni ainsi 4 gr. 5 environ de poudre mycélienne.

Pour préparer la solution diastasique, on a trituré peu à peu 200 milligrammes de poudre dans 100 cent. cubes d'eau, ajouté 1 cent. cube et demi de toluène, transvasé le tout dans un flacon et laissé macérer dans l'étuve, à + 35 degrés. Après vingt-quatre heures, durant lesquelles on a agité plusieurs fois, la solution a été versée sur un filtre à analyse. Elle a passé rapidement, limpide et incolore. On en a pris 5 cent. cubes par expérience, quantité équivalant à 10 milligrammes de poudre mycélienne.

Cette quantité de solution diastasique ajoutée seule, sans acide, à 15 grammes de saccharose dissous dans 80 cent. cubes d'eau, en hydrolysait environ 65 milligrammes en vingt-quatre heures à la température de + 28 degrés, au début de nos recherches, et encore 60 milligrammes environ à la fin, après quatre mois et demi. La sucrase contenue dans la poudre mycélienne qui servait, au fur et à mesure des besoins, à préparer la solution diastasique, était donc beaucoup plus stable que celle de la poudre de levure de nos expériences antérieures.

D'après les essais effectués sur une solution diastasique obtenue avec 500 milligrammes de poudre au lieu de 200, 1 gramme de poudre d'*Aspergillus* donnait :

Substances solubles dans l'eau		0 gr. 380
Alcalinité de ces substances à l'hélianthine .	0 c.c.	30 de SO^4H^2 normal.
Alcalinité de ces substances à l'alizarine . .	0 c.c.	175 de SO^4H^2 normal.
Acidité de ces substances à la phtaléine. . .	0 c.c.	10 de NaOH normale.
Cendres solubles dans l'eau		0 gr. 036
Alcalinité de ces cendres à l'hélianthine . . .	0 c.c.	12 de SO^4H^2 normal.

Ainsi, comme la solution diastasique de levure étudiée dans notre précédent mémoire, celle d'*Aspergillus* avait une réaction alcaline à l'hélianthine et à l'alizarine sulfoconjuguée, acide à la phtaléine du phénol. Pour saturer au premier de ces réactifs colorants la légère alcalinité due aux substances solubles de 10 milligrammes de poudre mycélienne, quantité mise en usage dans chaque expérience, il fallait 3 cent. cubes d'acide sulfurique supposé 1/1.000 normal, soit à peu près, comme

on le verra plus loin, 3,5 p. 100 de la proportion de même acide reconnue la plus favorable à l'hydrolyse diastasique. Il nous a paru superflu de tenir compte de cette petite correction dans les chiffres qui expriment nos résultats, le degré d'approximation auquel nous avons essayé d'atteindre étant de 10 p. 100.

Nous rappelons que dans chaque expérience il y avait 15 grammes de saccharose dissous dans 85 centimètres cubes de liquide total : eau, acide et diastase, et que les concentrations en acides, données dans le tableau, se rapportent à ces 85 cent. cubes.

Le saccharose et les acides étaient les mêmes que dans les expériences avec la sucrase de levure.

Voici maintenant les résultats obtenus. Les acides essayés sont répartis par groupes, suivant leur basicité, et rangés dans chaque groupe par ordre d'activité décroissante. Les concentrations optima sont d'abord exprimées en molécules-grammes par litre puis rapportées, dans la troisième colonne, à celle de l'acide chlorhydrique, faite égale à 100. Enfin, pour faciliter les comparaisons, nous avons ajouté un extrait du tableau relatif aux expériences effectuées avec la sucrase de la levure.

On voit, par ces résultats, que les conclusions générales tirées de nos expériences antérieures s'appliquent aussi à la sucrase d'*Aspergillus niger*. Seulement, dans ce cas, l'influence réciproque de la diastase et des radicaux acides ou anions est plus forte que dans celui de la sucrase de levure, la perturbation apportée de ce fait dans l'ordre de classement des acides est plus accentuée.

On voit en même temps que les concentrations optima d'acides sont presque toujours très différentes pour les deux sucrases. Fernbach avait observé autrefois qu'il fallait des quantités plus grandes d'acide acétique pour favoriser l'action de la sucrase d'*Aspergillus* que celle de la sucrase de levure (1). Aux grandeurs près, cette observation est confirmée, mais, chose curieuse, elle ne peut être étendue à tous les acides. Si, en effet, d'après nos expériences, la plupart des acides sont

1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IV, p. 647 (1890). Il avait obtenu le maximum d'activité avec 1 p. 100 d'acide acétique dans le cas de l'*Aspergillus* et 0,2 p. 1000 dans celui de la levure (soit, en molécules-grammes par litre, m/6 et m/300).

moins actifs avec la sucrase d'*Aspergillus*, il en est, comme l'acide propionique, dont la concentration optima est la même que pour les deux sucrases et d'autres, comme les acides formique, phosphorique et surtout nitrique, qui, au contraire, agissent à des doses plus faibles avec la sucrase d'*Aspergillus niger* qu'avec la sucrase de levure.

NOMS DES ACIDES	CONCENTRATIONS OPTIMA AVEC LA SUCRASE D'ASPERGILLUS — Trouvées.	CONCENTRATIONS OPTIMA AVEC LA SUCRASE D'ASPERGILLUS — Rapportées à HCl = 100.	CONCENTRATIONS OPTIMA AVEC LA SUCRASE DE LEVURE — Trouvées.	CONCENTRATIONS OPTIMA AVEC LA SUCRASE DE LEVURE — Rapportées à HCl = 100.	ACTIVITÉ catalytique des acides seuls (*).
Monobasiques :					
Nitrique	m/6.500	309,5	m/3.500	125	100
Trichloracétique	m/5.000	238	m/12.000	430	75,4
Benzène sulfonique	m/4.500	214	m/13.000	465	104,4
Dichloracétique	m/4.500	214	m/6.000	215	27,1
Chlorhydrique	m/2.100	100	m/2.800	100	100
Monochloracétique	m/900	42,8	m/2.000	71,5	4,84
Formique	m/450	21,4	m/400	14,3	1,53
Acétique	m/50	2,38	m/300	10,7	0,40
Propionique	m/10	0,48	m/10	0,36	»
Isobutyrique	m/7	0,33	m/16	0,57	0,33
Butyrique normal	m/7	0,33	m/12	0,43	»
Lactique	m/7	0,33	m/15	0,53	1,07
Bibasiques :					
Sulfurique	m/2.000	95,25	m/3.600	128,5	107,2
Oxalique	m/480	22,85	m/500	17,9	37,14
Tartrique	m/180	8,57	m/275	9,82	»
Tribasiques :					
Phosphorique	m/830	39,5	m/550	19,6	18,63
Citrique	m/260	12,4	m/310	11,1	5,17
Borique	m/3	0,14	m/4	0,14	»
Sels acides :					
Sulfate monopotassique	m/500	23,8	m/850	m/30,4	»
Phosphate monopotassique	m/9	0,43	m/11	0,39	»

(*) D'après les expériences d'Ostwald.

Ce ne sont pas les sels ni les autres substances thermostables, accompagnant la sucrase, qui paraissent occasionner ces différences. Sans doute, en ajoutant un sel neutre au

mélange d'acide et de sucrase en réaction sur le saccharose on ralentit la vitesse de l'hydrolyse, mais la diminution n'est mesurable que si la quantité de sel neutre est assez grande, par exemple, une molécule de sel pour une d'acide; elle ne l'est pas si cette quantité est de l'ordre de grandeur de celle qui existe dans la solution diastasique. Nous avons, dans une série d'expériences de contrôle, remplacé 5, 10 et même 15 cent. cubes d'eau par un égal volume de solution diastasique préalablement chauffée : soit en l'absence d'acide, soit en présence d'acide acétique ou d'acide sulfurique, nous n'avons pas obtenu de modification notable de la vitesse de l'hydrolyse. Ou bien les quantités de saccharose transformées étaient les mêmes, ou bien les différences restaient comprises dans la limite d'approximation. C'est à la partie thermolabile de la solution diastasique que restent imputables les modifications de l'activité catalytique des acides vis-à-vis du saccharose.

Ainsi, non seulement la concentration en ions hydrogène la plus favorable à l'hydrolyse conditionnée par la sucrase varie d'une manière importante avec la nature de l'acide ajouté, mais il peut y avoir, pour un même acide, des concentrations optima en ions hydrogène notablement différentes suivant l'origine de la substance diastasique.

ERRATUM

Mémoires de MM. Marchoux et Sorel, sur la Lèpre, pages 675 et 778.

Le n° 1 des conclusions du 2e mémoire, page 801, doit être reporté, sous le n° 12, à la suite des conclusions du 1er mémoire, page 700.

Le Gérant : G. Masson.

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

62e ANNÉE DÉCEMBRE 1912 N° 12

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

L'AGALAXIE CONTAGIEUSE DE LA BREBIS ET DE LA CHÈVRE

par H. CARRÉ

Chef du laboratoire des recherches sur les maladies infectieuses à l'École vétérinaire d'Alfort.

(Avec les planches XXI à XXIII.)

Le présent mémoire a surtout pour objet l'étude expérimentale de l'agalaxie contagieuse; mais, comme la littérature française ne comporte que deux articles sur ce sujet (1), tous deux publiés avant l'apparition de communications et de travaux originaux d'un haut intérêt, nous avons jugé utile de réunir, sous une forme succincte, les données éparses dans les différentes publications françaises et étrangères, de façon à donner une revue d'ensemble permettant de se faire une idée aussi exacte que possible des connaissances acquises jusqu'à ce jour sur cette affection.

Une courte relation historique, clinique, étiologique et expérimentale précédera donc l'exposé de nos recherches personnelles.

Historique.

Ce sont les auteurs italiens qui ont apporté la contribution la plus importante à l'étude de l'agalaxie; la maladie sévit en effet depuis fort longtemps dans la péninsule, constituant

(1) Bournay, L'agalaxie infectieuse, *Revue vétérinaire*, 1896, p. 65, et Nocard et Leclainche, *Traité des maladies contagieuses des animaux*.

encore actuellement un véritable fléau pour les troupeaux qu'elle envahit.

Sous le nom de Stornarella, Metaxa la signale pour la première fois sur les chèvres et sur les brebis, en 1816; puis Zangger la rencontre en Suisse sur les chèvres.

Dinella et Provinzano l'étudient en 1862 dans la Basilicate et dans les Pouilles : ils rapportent que les bergers croient à l'infection des troupeaux par le séjour dans les herbages fréquentés auparavant par des malades (Mal del sito).

Brusasco (1871) publie un intéressant mémoire sur cette maladie, que les bergers du Piémont désignent sous le nom de Mal dell'asciutto (mal du sec); il réussit à infecter quelques animaux par la traite.

D'autres vétérinaires affirment que la maladie se développe après l'introduction d'un animal malade dans un troupeau indemne. Cependant, Oreste, en 1882, 1884 et 1885, expérimentant sur quelques animaux seulement, ne réussit pas à transmettre l'agalaxie par l'ingestion du lait (deux animaux), du sang, du mucus nasal, ni par cohabitation : il affirme qu'il s'agit d'une enzootie dénuée de pouvoir contagieux.

Valentini (1889-1890) n'obtient que des résultats négatifs en faisant cohabiter des malades avec des sujets sains, en injectant du lait altéré dans les canaux galactophores, en inoculant sous la peau de la synovie ou de l'humeur aqueuse d'ovins atteints de polyarthrites ou de kératite.

Rocco Marra, en Italie, Barthélemy en France, Schossleitner, dans le Tyrol, publient des descriptions sommaires de la maladie.

Le Dr Marra (1891) en inoculant le lait altéré dans le trayon ou sous la peau de la cuisse, aurait reproduit l'agalaxie en vingt-quatre-quarante-huit heures.

Par contre, Hess et Guillebeau, qui donnent une bonne description des lésions oculaires et des troubles de la sécrétion du lait, ne réussissent pas à obtenir l'infection par cohabitation, ni en injectant le lait dans la mamelle ou sous la peau de chèvres saines.

Oreste et Marcone publient en 1892 les résultats de leurs recherches expérimentales.

Bournay, la même année, observe l'affection dans les

Pyrénées-Orientales : il poursuit quelques recherches avec Leclainche et résume, dans une monographie, les connaissances acquises à cette époque.

Celli et de Blasi (1896-1897) reproduisent deux fois l'agalaxie en inoculant sous la peau le lait altéré caractéristique. En 1906, ils annoncent leur découverte d'un virus filtrant et publient le compte rendu de quelques expériences de vaccination.

Rocco Marra et Nicola Cocciante (1912) montrent que le sang recueilli au moment de l'élévation thermique, dans les formes graves, est virulent.

Nous-même, enfin, faisons connaître une pyohémie spéciale, complication de l'agalaxie, localisée dans les départements du sud-est de la France et connue sous le nom de Mal de Lure.

Distribution géographique.

L'agalaxie n'existe qu'en Europe et seulement dans des régions assez étroitement limitées. C'est surtout une affection des pays montagneux. Très répandue en Suisse à un moment donné, elle paraît avoir sinon disparu, tout au moins considérablement réduit son aire de dispersion.

Connue depuis longtemps sur le versant espagnol des Pyrénées (Bournay), on l'observe également dans la Provence, le Roussillon et la Cerdagne.

Depuis quelques années, les départements du sud-est de la France, Basses-Alpes, Vaucluse, Drôme, Bouches-du-Rhône et Alpes-Maritimes voient l'épidémie prendre une extension de plus en plus grande.

C'est par milliers que les ovins et les caprins des régions centrales de l'Italie sont chaque année envahis par l'agalaxie.

Il est curieux de constater que, malgré sa grande contagiosité, l'agalaxie ne paraît avoir aucune tendance à s'étendre hors des départements énumérés plus haut.

Il n'est pas douteux cependant que si les régions infectées produisaient des reproducteurs pour le dehors, au lieu de se borner exclusivement à l'élevage des animaux de boucherie, l'épidémie gagnerait, et très vite, des centres jusque-là indemnes.

Importance économique.

La morbidité est toujours assez élevée; quelques rares animaux paraissent seuls échapper à l'infection. La gravité de celle-ci, essentiellement variable, est cependant la cause de pertes pécuniaires élevées. Les animaux maigrissent, deviennent étiques et invendables pour la boucherie; les brebis, dans la très grande majorité des cas, gardent leur mamelle atrophiée, ne donnent plus de lait et sont incapables d'élever leurs agneaux.

Tandis que dans certains troupeaux la mortalité est considérée comme insignifiante, elle atteint dans d'autres les deux tiers de l'effectif. Si, en général, un assez grand nombre d'animaux semblent échapper à la contagion, ou mettent un temps plus ou moins long à s'infecter, ce qui tient à des causes que nous étudierons plus loin, nous connaissons, par contre, des exploitations où tous les animaux sans exception, jeunes et adultes, mâles et femelles, brebis et chèvres, ont présenté rapidement des symptômes graves, nécessitant l'envoi immédiat à la boucherie de la totalité du troupeau.

Le vétérinaire départemental des Basses-Alpes, M. Arlaud, estime que les pertes dues à l'agalaxie, en 1911, dans son département, ont été incomparablement plus élevées que celles dues à la fièvre aphteuse.

Par ce qu'il nous a été donné de constater nous-même, cette opinion nous paraît parfaitement fondée.

Clinique.

L'affection, facilement diagnostiquée, présente des symptômes généraux et des symptômes locaux portant sur la *mamelle*, l'*œil*, les *articulations*, et, ajouterons-nous, parfois sur la *peau*; symptômes extrêmement variables dans leur intensité et leur répartition, ce qui a permis de distinguer une *forme aiguë* et une *forme chronique*.

Forme aiguë. — Parfois presque foudroyante : la température atteint 40-41 degrés; affaiblissement général, inappétence

et mort avant l'apparition des lésions. Si la marche est moins rapide, la mamelle, atteinte presque toujours chez les femelles laitières, est tuméfiée, chaude, douloureuse.

Quand l'inflammation s'atténue, l'organe reste flasque, mou, ou induré, atrophié, avec des noyaux plus ou moins profonds et volumineux, durs; un seul ou les deux quartiers peuvent être lésés.

Une boiterie généralement très intense annonce les localisations articulaires, qui, par ordre de fréquence, se portent sur le carpe et le tarse, puis sur les articulations fémoro-tibiale, huméro-radiale, coxo-fémorale, métacarpienne (Hess et Guillebeau).

Tout déplacement est presque impossible, l'animal reste couché à la même place des jours entiers : la région articulaire augmente de volume, devient très douloureuse; parfois, mais rarement, des abcès s'ouvrent, lents à se cicatriser, suivis ou non de l'ankylose des surfaces articulaires.

La lésion primitive de l'œil est une kératite parenchymateuse : d'abondantes larmes souillent les paupières dont les bords sont rouge vif. La cornée est trouble, de teinte plus ou moins laiteuse; on croirait que la chambre antérieure est remplie de pus; il n'en est rien cependant et l'incision de l'œil montre que la cornée, très épaissie, donne seule à l'organe cet aspect particulier, l'humeur aqueuse est parfaitement limpide. Un large liséré rouge foncé ou brun entoure la cornée. Le globe oculaire est tendu, volumineux, douloureux. La cornée, par l'effet de la pression interne, peut être déchirée, l'iris rejeté en dehors, et le cristallin, luxé, sort par la fistule sous forme d'une gelée translucide : la vision est abolie. La suppuration envahit parfois la chambre antérieure; le pus s'écoule sur les côtés de la face, donnant à celle-ci un aspect véritablement hideux (fig. 1).

Mais les lésions peuvent rester minimes, les ulcérations de la cornée se cicatrisent, elle reprend même presque complètement sa transparence.

Il persiste toutefois assez longtemps de petites facettes planes sur la cornée: on dirait que celle-ci, frappée par un instrument contondant, a conservé l'empreinte du choc (observation personnelle).

Nous ajouterons, comme observation personnelle également, l'apparition, sur une étendue plus ou moins grande de la surface cutanée, de vésico-pustules arrondies, parfois confluentes. On avait déjà signalé la présence de petits abcès cutanés sur les parties dénudées, face et parties latérales de la tête, mais, en faisant tondre en entier les animaux, on peut constater facilement l'éruption généralisée que nous signalons, dans des cas exceptionnels cependant.

Forme chronique. — Les symptômes généraux passent inaperçus le plus souvent. La mamelle est affectée en totalité ou en partie seulement : elle s'atrophie, les trayons deviennent flasques et l'on perçoit des noyaux d'induration arrondis, situés plus ou moins profondément dans la glande, mais, souvent, à la base du trayon.

S'il y a des accidents articulaires, on constate la tuméfaction des épiphyses et l'hydropisie des gaines ; en pressant l'articulation et en cherchant à faire mouvoir le membre, auquel la distension des ligaments articulaires permet des déplacements latéraux assez étendus, on perçoit à la main, on entend même parfois nettement à distance, une crépitation spéciale (obs. personnelle).

Les malades marchent à genoux ou en traînant le train postérieur sur le sol, ou restent continuellement couchés.

Parfois la boiterie n'est pas permanente. Tel animal dont l'un des membres est soustrait complètement à l'appui pendant plusieurs jours, se met à marcher droit presque subitement, puis la boiterie réapparaît, moins accentuée généralement. On peut constater ainsi plusieurs attaques successives : il s'agit alors de lésions peu graves, sans déformation bien appréciable de l'articulation. C'est à cette forme que Barthélemy donnait, avec justesse, le nom de rhumatisme arthritique.

L'œil présente une simple opacité de la cornée ou de la kératite parenchymateuse, de l'ophtalmie interne et, mais rarement, des complications purulentes. D'après Rocco Marra, les béliers et les boucs montrent parfois de l'inflammation du scrotum. On a signalé, et nous l'avons constaté nous-même, des abcès en diverses régions, parotide, médiastin, muscles (Hess et Guillebeau).

Ces abcès sont dus à des pyogènes vulgaires (staphylocoques et streptocoques) comme nous nous en sommes assuré.

Les malades maigrissent considérablement et meurent dans un état de cachexie complète, si leur envoi à la boucherie ne vient pas interrompre l'évolution de la maladie.

Durant l'épidémie et l'année d'après, les agneaux qui naissent meurent de la maladie ou, faute de lait, périssent de faim; les brebis avortent, donnent des mort-nés ou des monstres (Celli et de Blasi).

Nous avons constaté, expérimentalement, la justesse de ces observations (Voy. paragraphe : *Des agneaux*).

L'altération du tissu musculaire est remarquable; l'animal peut encore présenter un certain état de graisse, mais l'atrophie des muscles le fait paraître étique.

Par l'exposé clinique qui précède, on voit combien le terme d'agalaxie, appliqué à une maladie générale avec localisations aussi variées, est insuffisant et inexact.

On ne peut rapprocher l'agalaxie d'aucune autre affection de l'homme ni des animaux : c'est une entité morbide d'un caractère tout à fait spécial.

Altération du lait.

Le lait d'une mamelle infectée subit des altérations profondes dans son aspect, ses qualités physiques et chimiques. En réalité, très rapidement, le liquide sécrété n'est plus du lait : dès le début, il est crémeux ou aqueux. Dans le premier cas il diminue de suite de quantité, dans le second il peut encore être assez abondant. Il se sépare nettement en deux couches : l'une supérieure, séreuse, plus ou moins louche, de teinte parfois un peu verdâtre, et une autre, inférieure, composée de grains, de grumeaux, de tortillons formés d'une matière puriforme, qui adhèrent aux parois du vase et se rassemblent au fond.

Parfois, une faible épaisseur de globules rouges s'intercale entre les deux couches.

Quand la sécrétion mammaire va totalement cesser, la mulsion permet d'obtenir, avec une très faible quantité de liquide séreux, la matière puriforme qui prend, par son passage forcé

à travers l'étroit orifice du trayon, la forme de gros vermicelle.

Toujours, le liquide altéré possède une saveur salée caractéristique. Il est quelquefois assez difficile d'obtenir le liquide accumulé dans le sinus mammaire, l'orifice du trayon étant généralement obstrué par un petit bouchon qu'il convient d'écraser sous les doigts ; il est bientôt remplacé par un autre ; mais l'extraction en est plus facile. Les doigts qui opèrent la première mulsion perçoivent nettement une crépitation spéciale : il semble que de l'air est enfermé et chassé de quelques vacuoles; en réalité, cette crépitation est due, selon toute probabilité, à l'écrasement des grumeaux puriformes (Obs. personnelle).

L'aspect du liquide extrait de la mamelle permet d'apprécier le caractère de l'inflammation.

Dans les cas chroniques, ce liquide est séreux; si l'inflammation est aiguë, il se prend en un caillot, jaune verdâtre, peu résistant.

Déposé sur un filtre de toile, ce caillot laisse exsuder rapidement la presque totalité du liquide qui l'imprègne, liquide assez limpide.

Le fromage obtenu avec le lait altéré est de mauvaise qualité, sec, maigre : sur la coupe, il se montre criblé de petits trous, alors que le fromage normal est creusé de larges vacuoles, peu nombreuses (Oreste et Marcone, Hess et Guillebeau).

Modifications chimiques éprouvées par le produit de sécrétion des mamelles malades.

Les liquides analysés provenaient : 1° de six chèvres non encore infectées et 2° des mêmes animaux atteints de mammite.

La matière grasse fut dosée dans ces deux échantillons au moyen du procédé Adam, modifié par Meillère. La même prise d'échantillon servit ensuite au dosage des matières albuminoïdes d'après les indications de Patein et Deval et enfin à la détermination du lactose au moyen de la liqueur cupro-potassique.

Le procédé Kjeldahl fut utilisé pour les dosages de l'azote

total et de l'azote des différentes fractions des matières azotées.

Dans le tableau suivant, qui renferme les résultats obtenus, l'azote de la caséine représente l'azote des matières précipitées à la température ordinaire par l'acide acétique et l'acide carbonique; l'azote des albumines est l'azote des matières non précipitées par l'acide acétique et l'acide carbonique, mais précipitées par l'acide phospho-tungstique; enfin l'azote amidé est l'azote des substances non précipitées par l'acide phospho-tungstique.

L'examen du tableau montre des modifications intéressantes, analogues, du reste, à celles constatées par Hess et Guillebeau dans leur travail sur l'agalaxie infectieuse des chèvres.

Ces modifications portent d'abord sur les éléments caractéristiques de l'activité de l'épithélium glandulaire : la caséine, le lactose et la matière grasse.

La matière grasse tombe de 33 gr. 4 par litre à 6 gr. 8 et le lactose de 32 gr. 1 à 2 gr. 9. Dans le lait pathologique, la phénylhydrazine permet de constater qu'il s'agit bien de lactose et non de glucose.

Les matières albuminoïdes augmentent notablement et cet accroissement se fait surtout sentir pour les matières albuminoïdes vraies (albumine et globuline), ce que montrent nettement les chiffres relatifs aux diverses portions de l'azote et leur pourcentage par rapport à l'azote total.

L'acidité évaluée en acide lactique par litre est manifestement déprimée. Cette diminution doit être attribuée à la disparition de l'acide carbonique dissous, mais aussi à la présence d'une dose notable d'ammoniaque, résultant de l'action des microbes sur les matières albuminoïdes.

Les cendres ont à peine varié comme poids total, mais leurs différents composants ont nettement changé de proportions.

Une diminution frappante porte sur l'acide phosphorique, la chaux et la magnésie; une augmentation nette du chlore explique le goût salé du lait. Le lait normal contenait 2 gr. 08 de chlore par litre (correspondant à 3 gr. 43 de ClNa); le produit de sécrétion des mamelles malades en accusait 3 gr. 53 (correspondant à 5 gr. 82 de ClNa).

Ces modifications, qu'une analyse détaillée met en évidence, ne sont pas particulières à la manifestation mammaire de l'aga-

laxie. Dans les mammites, ainsi que l'a indiqué Monvoisin (1), les cellules des acini étant atteintes dans leur intégrité anatomique et physiologique, les produits résultant de leur activité sont élaborés en moins grandes quantités ; le lait fourni par une mamelle malade passe insensiblement de la composition du lait normal à celle du sérum sanguin, aussi bien en ce qui concerne les matières organiques que les matières minérales.

LAIT DE CHÈVRES	NORMALES	AGALAXIQUES
Densité (à 15 degrés)	1.029	1.023
Acidité (en acide lactique)	1 gr. 4	0 gr. 7
Résidu sec	121,95	88,3
Matière grasse	33,4	6,8
Lactose	34,1	2,9
Matières albuminoïdes	43,9	67,4
Cendres	9,8	9,6
Point de congélation	— 0°565	— 0°545
Azote total	7 gr. 026	10 gr. 308
Azote de la caséine	3,735	4,690
Azote des albumines	2,660	4,853
Azote amidé	0,631	0,765
Azote de la caséine (en centièmes de l'azote total)	53,15	45,49
Azote de l'albumine (en centièmes de l'azote total)	37,86	47,08
Azote amidé (en centièmes de l'azote total)	8,99	7,43

Analyse des cendres (par litre).

Chlore	2 gr. 08	3 gr. 33
Acide phosphorique	1,61	0,72
Chaux	1,80	0,31
Magnésie	0,520	0,101

Anatomie pathologique (d'après Celli et de Blasi).

I. *Glande mammaire*. — A l'œil nu, dans l'agalaxie confirmée, les mamelles sont diminuées de volume, dures, et sur la coupe on voit que les acini sont remplacés par du tissu conjonctif de nouvelle formation. L'examen microscopique montre un processus de mammite interstitielle caractérisée par la disparition du tissu glandulaire avec substitution de tissu fibreux

(1) Monvoisin, *Journal de physiologie et de pathologie générale*, janvier 1910, et *Journal de pharmacie et de chimie*, juillet 1910.

plus ou moins condensé suivant la durée de la maladie. La néoformation conjonctive ne se limite pas seulement au parenchyme glandulaire péri-acineux, mais s'étend aussi aux conduits inter-acineux de moyen et de grand calibre, déterminant la production de polypes fibreux endo-canaliculaires revêtus d'un épithélium; dans quelques cas, ces polypes obstruent complètement la lumière des tubes.

De telles formations s'observent surtout dans les cas très avancés. Dans les formes plus avancées encore, outre l'atrophie du parenchyme glandulaire, on peut observer de la dégénérescence calcaire, etc... Rares sont les suppurations et les abcès de la mamelle; on ne les rencontre que lorsqu'il y a engorgement lacté, quand on abandonne les femelles sans les traire.

Plus rares encore sont les abcès péri-articulaires et intramusculaires.

II. *Œil.* — La lésion débute par de l'hyperhémie péricornéale : dans la suite, on observe de la kératite parenchymateuse interstitielle avec taches cornéales. A l'examen microscopique, on note une infiltration parvicellulaire et des néoformations vasculaires dans l'épaisseur de la cornée.

Ce processus peut régresser ou entraîner la perforation de la cornée, le staphylome de l'iris, l'évacuation du contenu de l'œil et la panophtalmie.

Suivant ces différentes complications, la maladie peut guérir complètement, laisser de simples leucomes ou des cicatrices avec cécité plus ou moins complète.

III. *Articulations.* — La lésion est caractérisée par de l'infiltration et de l'engorgement du tissu conjonctif périarticulaire. A la coupe, celui-ci se montre épaissi et infiltré de sérosité, alors que la synoviale, la synovie et les cartilages apparaissent normaux. D'autres fois, la synovie augmente de quantité et devient rougeâtre, la synoviale s'épaissit, montre des foyers nécrotiques et de l'infiltration parvicellulaire, érosion des cartilages articulaires : plus rarement des fongosités polypeuses formées de tissu conjonctif jeune. D'habitude, ces lésions régressent complètement, l'ankylose est rare. Dans le tissu articulaire, on note un processus d'endo-artérite.

Documents expérimentaux.

Les différents savants qui ont tenté l'étude expérimentale de l'agalaxie, Hess et Guillebeau, Oreste et Marcone, Bournay et Leclainche, Celli et de Blasi, sont unanimes à déclarer qu'aucun microbe, isolé des lésions, ne s'est montré capable de reproduire la maladie.

On rencontre, en effet, parfois, par la culture, dans le lait agalaxique, des formes microbiennes diverses, les trois variétés du staphylocoque notamment et le streptocoque.

Nous avons étudié, dans un précédent mémoire, une pyohémie spéciale, consécutive à l'agalaxie et reconnaissant comme agent spécifique un fin bacille doué de caractères bien tranchés (1).

Le contenu des lésions fermées de l'œil et des articulations se montre stérile le plus souvent : on peut même, comme nous l'avons réalisé maintes fois, ensemencer assez largement du lait agalaxique recueilli avec quelques précautions, sans constater la moindre culture de microbes colorables. De fait, ainsi que l'ont démontré en 1906 Celli et de Blasi, l'agent spécifique de l'agalaxie est un virus filtrant.

Nous donnons ci-après *in extenso*, les conclusions de Celli et de Blasi qui résument tout ce qui avait été établi avant nos recherches ; au point de vue expérimental on verra quelle part importante ils ont apportée dans l'étude de l'agalaxie.

1° L'agalaxie du mouton et de la chèvre est incontestablement une maladie contagieuse par le moyen du lait, qui présente des altérations caractéristiques ;

2° ..... ;

3° Toutes les nombreuses tentatives bactériologiques et histologiques faites pour mettre en évidence et cultiver l'agent causal de l'agalaxie se sont toujours montrées infructueuses ;

4° L'agalaxie est due à un virus filtrant éliminé avec le lait malade ;

5° L'ultra-microscope ne permet aucune différenciation parmi les particules colloïdes du lait filtré ;

(1) Voy. Le mal de Lure. *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1912.

6° Expérimentalement avec le virus (lait) filtré sur Berkefeld et sur Silbersmith, au moyen d'inoculations dans le sinus galactophore et dans le tissu mammaire, on peut reproduire l'agalaxie ; au moyen d'inoculations dans la cornée ou dans le conduit galactophore, ou sous la peau, l'altération oculaire ; par inoculation intra-articulaire, l'arthrite agalaxique ; et enfin, par l'inoculation sous-cutanée, oculaire et endo-articulaire, le cadre complet de la maladie. En dehors du mouton et de la chèvre, il est encore possible de reproduire la kératite parenchymateuse chez le lapin en injectant le filtrat dans la chambre antérieure ;

7° Le tableau anatomo-pathologique de l'agalaxie et des autres localisations expérimentales est identique à celui de l'infection naturelle ;

8° Rien de semblable ne peut être reproduit par l'injection des bactéries isolées du lait, des yeux ou des articulations ;

9° Pour reproduire expérimentalement l'agalaxie, dans le sens étroit du mot, on donnera la préférence à l'injection dans le conduit galactophore, sous-cutanée ou endo-articulaire. Il suffit parfois de déposer le virus à l'entrée du trayon. L'agalaxie doit, par conséquent, se transmettre dans la nature par contagion directe ou semi-directe, ou par inoculation. Nous ne pouvons pas affirmer que les arthropodes jouent un rôle quelconque dans la transmission de l'affection ;

10° Le virus du lait de la chèvre (expérimental) ne paraît pas se différencier de celui de la brebis ;

11° Le virus de l'agalaxie est plutôt labile, car, même conservé dans de bonnes conditions, à 15 degrés dans l'obscurité, il s'atténue en moins de deux mois. Cette propriété confirme indirectement la transmission par les modes sus-indiqués ;

12° Le virus de l'agalaxie s'atténue, ou tout au moins ne s'exalte pas par le passage d'animal à animal, d'œil à œil. Une atteinte de la maladie est suivie de l'immunité ;

13° Nous avons des raisons de croire que l'immunité expérimentale peut être réalisée.

D'une autre série d'expériences, les mêmes auteurs dégagent ces nouvelles conclusions :

1° Le virus conservé deux mois à 14 degrés est inactif ;

2° Chauffé pendant une heure à 40-45 degrés, le virus possède des propriétés immunisantes;

3° Le pouvoir infectant des humeurs de l'organisme malade est au maximum dans la toute première période (*primissimo periodo*) de la maladie.

Enfin, en avril 1912, MM. Rocco Marra et Nicola Cocciante, opérant sur un nombre très élevé d'animaux, montrent que le sang recueilli dans les formes graves au moment de l'élévation thermique, est virulent; ils annoncent leur découverte d'un vaccin, remettant à plus tard des indications sur leur façon de le préparer.

Il nous a semblé cependant qu'il restait encore à élucider bon nombre de questions importantes. L'envahissement rapide de nos départements du Sud-Est nous offrait un vaste champ d'expériences; l'empressement de nos confrères à nous procurer des sujets malades, les plaintes réitérées et trop fondées des éleveurs, nous décidèrent à poursuivre l'étude de l'agalaxie, étude que nous avions déjà commencée avec le Mal de Lure.

Produits virulents.

Sans mettre le moins du monde en doute les résultats obtenus par nos devanciers, nous avons été amené, surtout dans le but de posséder le virus agalaxique *à l'état pur*, à rechercher la virulence dans le lait altéré, dans la cornée et dans la sérosité articulaire.

Nous pouvions l'obtenir facilement par la filtration, mais, étant donné le but que nous poursuivions, ce procédé ne pouvait nous rendre aucun service. Il est en effet préférable d'opérer avec des produits non filtrés, incomparablement plus riches en éléments virulents.

Pour nous, la filtration n'offre qu'un intérêt très relatif; elle introduit d'ailleurs dans l'expérimentation une complication et des causes d'erreurs auxquelles on doit s'efforcer d'échapper lorsque la chose est possible.

Il est tellement facile de démontrer la virulence du lait, du suc de cornée malade ou de la sérosité des articulations atteintes, que l'on reste confondu devant les résultats négatifs

enregistrés par certains auteurs. Ces résultats ne peuvent s'expliquer autrement que par l'emploi, comme sujets d'expérience, d'animaux provenant de milieux infectés et ayant acquis l'immunité. Il est douteux que l'on puisse rencontrer des animaux naturellement réfractaires à la maladie. Placé comme nous le sommes, loin des foyers d'agalaxie, n'utilisant que des moutons nés au laboratoire ou d'origine connue, nous n'avons pu que constater leur grande réceptivité.

I. *Infection par injection de lait dans la mamelle.* — Une seule précaution nous paraît indiquée, celle de n'utiliser que des femelles présentant encore une sécrétion mammaire, si minime soit-elle. A deux reprises, sur des vieilles brebis ne possédant que des mamelles totalement atrophiées, nous avons vu l'injection d'un produit sûrement virulent rester négative, tandis que d'autres animaux du même lot, dont la mamelle donnait encore à la mulsion quelques gouttes de sérosité, contractaient une mammite typique.

Nous n'avons que l'embarras du choix dans nos notes d'expériences pour montrer que l'injection du lait agalaxique dans le trayon provoque toute la gamme des accidents, depuis les formes aiguës jusqu'aux localisations éloignées, arthrite et kératite.

Brebis 557. — Dans le trayon droit, 1/2 cent. cube liquide mammaire agalaxique de chèvre ; cinq jours après, le trayon paraît rouge et turgescent, il donne 5 cent. cubes de liquide louche avec grumeaux puriformes. Quinze jours après, l'œil gauche est fermé, pleureur, la cornée est louche ; dans la suite l'animal reste couché, semblant parésié du train postérieur.

II. *Infection par injection du produit de broyage de la cornée dans la mamelle.* — 1° Une chèvre 545 reçoit, le 26 décembre 1911, dans le trayon gauche, 5 cent. cubes du liquide obtenu en broyant la cornée opaque d'une brebis envoyée d'Oraison (Basses-Alpes), par notre confrère, M. Allègre. Le 30, la mamelle donne assez difficilement un liquide filant, puriforme, jaune verdâtre. Le 2 janvier, le quartier gauche est volumineux ; la mulsion douloureuse, donne un liquide purulent avec grumeaux. La présence de pus n'a rien d'anormal étant donnée l'impureté forcée du liquide injecté. Le 8, la cornée droite est complètement opaque, entourée d'une large bande rouge foncé ; l'animal reste étendu sans mouvements.

2° Le 8 janvier, une chèvre 539 reçoit dans le trayon droit le liquide de broyage de la cornée droite de la chèvre 545 précédente. Le 18, l'animal boite du membre antérieur gauche dont le genou est sensible, l'œil gauche est à demi fermé. Le 19, la chèvre reste couchée, la tête repliée vers le flanc, le poil est piqué. Le trayon inoculé donne 15 cent. cubes de liquide louche avec grumeaux ; le 24, boiterie des deux membres postérieurs ; le 26, la cornée gauche est complètement opaque, d'une teinte laiteuse, entourée d'une large

bande rouge foncé. A partir du 25 février, cette lésion régresse; la cornée reprend peu à peu sa transparence; la mamelle ne donne plus que quelques centimètres cubes de liquide avec grumeaux; les membres reprennent leur liberté d'action.

III. *Infection par injection intraveineuse de liquide articulaire.* — Le 1er juillet 1911, on retire de l'articulation fémoro-tibiale d'une brebis 479, 4 cent. cubes de sérosité un peu louche et rosée. 1 cent. cube de cette sérosité est ensemencé en bouillon sérum et se montre stérile. 2 cent, cubes sont injectés dans la jugulaire d'un agneau 520.

Le petit animal maigrit assez rapidement. Le 10 juillet, il boite du membre antérieur gauche dont le boulet est sensible; le 18, la boiterie est plus accentuée, le boulet est engorgé, très douloureux; le 22, l'animal conserve pour manger la position à genoux. Il se rétablit lentement dans la suite.

Ces expériences prises parmi beaucoup d'autres, apportent la confirmation que le virus agalaxique se rencontre dans les différentes localisations et montrent que la lésion articulaire fermée est susceptible de le fournir à l'état pur; malheureusement, la quantité de sérosité est toujours très minime : le cas de la brebis 479 qui nous a donné 4 cent. cubes de liquide est tout à fait exceptionnel.

Par le relevé de nos expériences, nous avons pu établir assez exactement le temps que mettent à apparaître les différentes localisations suivant le mode d'infection adopté.

C'est en moyenne trois à quatre jours après l'introduction du virus dans la mamelle que le lait commence à s'altérer dans le trayon inoculé; parfois, assez rapidement, le deuxième quartier s'infecte à son tour, mais il peut aussi rester indemne très longtemps et même ne pas être atteint. La mulsion est parfois douloureuse, les animaux cherchent à fuir, à se défendre; mais nous avons rencontré des sujets manifestant la plus complète insensibilité à la traite, alors même que la glande tout entière était infectée et fournissait en abondance du lait altéré et mélangé à de nombreux tortillons puriformes, dont l'extraction nécessitait des pressions et des tractions énergiques.

A la suite du dépôt de virus dans la mamelle, cet organe peut rester seul atteint; l'état général de l'animal subit cependant des modifications plus ou moins rapides et profondes : il maigrit beaucoup et peut même devenir cachectique. D'autres guérissent, mais la convalescence est toujours longue et ce n'est parfois qu'après plusieurs mois que l'animal reprend un embonpoint à peu près normal.

Il s'écoule toujours un certain temps entre l'infection de la mamelle et l'apparition des autres localisations, oculaires ou articulaires, douze-quinze jours en moyenne.

Les localisations survenant après l'injection du virus dans le muscle (5 animaux) ont une incubation un peu plus courte : elle est de douze jours au maximum.

Enfin, par les voies digestives (12 animaux), ce n'est que dix-huit jours en moyenne après le repas infectant que les localisations se développent.

La chèvre s'est montrée, dans la généralité des cas, beaucoup plus sensible que la brebis à la maladie expérimentale.

Le virus filtrant.

Nos recherches à ce sujet confirment entièrement celles de MM. Celli et de Blasi : l'agent spécifique de l'agalaxie est un virus filtrant.

I. — Le 26 mai 1911, 3 brebis reçoivent dans le trayon gauche chacune 10 cent. cubes du liquide dilué de la mamelle d'une chèvre 510 (agalaxie naturelle, Nice) et filtré sur Berkefeld V.

Les n°s 479 et 480 donnent encore quelques cent. cubes de lait, le n° 481 a les mamelles totalement atrophiées.

Brebis 479. — Dès le 29, le quartier gauche est chaud, tendu. Dans la suite, la mamelle fournit un liquide louche, un peu verdâtre, avec grumeaux. Le 15 juin, éruption généralisée de vésico-pustules sur tout le corps, œdème de chaque côté de la face; jarret droit engorgé. Le 29, l'engorgement du jarret a augmenté, la sensibilité apparaît, l'animal boite; le 1er juillet, on retire aseptiquement 4 cent. cubes de sérosité un peu louche.

Le quartier droit s'infecte à son tour et fournit 50 cent. cubes de liquide séreux, verdâtre, alcalin, qui se prend en caillot comme une sérosité inflammatoire.

Brebis 480. — Le 1er juillet, le quartier gauche est beaucoup plus volumineux que le droit, qui est flasque; le 16, température 40°8; le 20, la mamelle est dure et donne difficilement quelques gouttes de liquide grisâtre, grumeleux; le 23, le boulet antérieur droit est engorgé, sensible; le 28, l'animal se tient à genoux et présente de la difficulté à se remettre debout.

Brebis 481. — N'a jamais eu la moindre lésion ni la moindre élévation de température, ce que nous croyons devoir attribuer à l'état d'atrophie de la glande qui n'a pas permis la culture du virus.

II. — Le 10 juin 1911, 10 gouttes de liquide de la mamelle de la brebis 479 sont diluées dans 200 cent. cubes de solution physiologique et filtrées sur Berkefeld V.

Une brebis en pleine lactation, 471, reçoit 20 cent. cubes de filtrat dans le trayon gauche. Le 12, le quartier gauche paraît plus volumineux que le droit. Le lait obtenu est un peu verdâtre, plus aqueux que celui du droit qui est

blanc mat. Le 16, le quartier gauche donne 50 cent. cubes de liquide verdâtre, alcalin. Le 20, on obtient 200 cent. cubes de liquide jaune verdâtre avec grumeaux puriformes; le quartier inoculé est énorme; on y sent des noyaux indurés, bosselant la peau; le 23, le liquide est louche et de petits tortillons nagent à sa surface; le 27, la quantité de liquide diminue. La mamelle s'atrophie dans la suite.

Le 4 juillet, une vieille brebis berrichonne avait reçu dans la jugulaire 5 cent. cubes du liquide mammaire 471. Le 10, raideur des quatre membres, surtout des postérieurs. Sacrifiée le 20, les articulations des genoux et des jarrets renferment de la sérosité roussâtre, stérile en bouillon sérum.

Conservation de la virulence dans la mamelle.

MM. Celli et de Blasi écrivent : « Le pouvoir infectant des humeurs de l'organisme est au maximum dans la toute première période (*primissimo periodo*) de la maladie. »

D'autre part, le Dr Rocco Marra, au cours d'une visite que nous fîmes ensemble à un troupeau infecté, dans la campagne romaine, m'affirma que le lait n'était virulent qu'au seul moment de l'élévation thermique. On retrouve encore cette même opinion exprimée dans le mémoire qu'il vient de publier avec le Dr Nicola Cocciante.

Des expériences entreprises antérieurement à mon voyage en Italie (octobre 1911) et continuées depuis sont en contradiction complète avec l'opinion de nos honorables collègues italiens.

Le 21 mai 1911, je recevais au laboratoire 5 animaux agalaxiques que je devais à l'amabilité de M. Scoffié, vétérinaire départemental des Alpes-Maritimes. Une vieille chèvre (n° 510) était particulièrement intéressante; elle présentait les lésions suivantes : l'œil droit un peu atrophié et enfoncé dans l'orbite montre, en son centre, une fistule donnant issue à du pus verdâtre, très riche en pyobacilles (1); les deux genoux sont lésés; on perçoit à la main, quand on oblige les membres à se fléchir, et on entend même nettement à distance, des craquements articulaires. Les deux quartiers de la mamelle renferment plusieurs noyaux indurés gros comme des noisettes; la mulsion permet d'obtenir, des deux trayons, un liquide séreux, louche, dans lequel flottent des grumeaux.

Dans la suite (mai à décembre 1911), la quantité de liquide obtenu diminue progressivement. On n'obtient plus que quelques centimètres cubes, puis quelques gouttes; enfin la sécrétion tarit totalement. Au 6 novembre, le quartier droit est complètement atrophié et on ne peut obtenir une seule goutte de liquide, deux noyaux indurés sont perçus à la base du trayon: le quartier gauche renferme un seul noyau induré et fournit encore 3-4 cent.

(1) Voy. Mal de Lure, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1er mai 1912.

cubes de liquide séreux, louche, avec grumeaux grisâtres, caséeux. Ce liquide louche et les grumeaux, ensemencés à plusieurs reprises en bouillon sérum de mouton et sur gélose sang, se sont montrés stériles ou n'ont donné que de rares colonies de staphylocoques.

Bien que la date exacte du début de la maladie de cet animal nous soit inconnue, nous estimons, d'après l'état des lésions, qu'elle remontait à un mois au minimum.

Cette chèvre fut conservée et le liquide de sa mamelle servit à toute une série d'expériences qui démontrèrent : 1° *la présence du virus filtrant de Celli et de Blasi*; 2° *la persistance de la virulence dans le lait.*

1° Le 7 juin 1911, un mouton d'un an, 430, reçoit dans la chambre antérieure de l'œil droit 2-3 gouttes du liquide mammaire 510. Dans les jours qui suivent, l'œil est à demi-fermé et larmoie abondamment; le 10, le trouble cornéen apparaît et s'accentue dans la suite. Le 5 juillet, une taie grisâtre s'étend sur toute la cornée, qui est entourée d'un large ruban rouge foncé. On peut piquer la cornée sans que l'animal présente la moindre réaction : Il y a anesthésie totale. L'animal se rétablit peu à peu sans autres localisations.

2° Le 2 juin 1911, 3 agneaux 437, 438 et 439, reçoivent chacun dans la jugulaire, 5 gouttes de liquide mammaire 510.

437. — Le 6 juin, l'œil droit commence à se troubler, la conjonctive est congestionnée, larmoiement intense; le 10, boiterie du membre antérieur droit; le 14, l'œil s'ulcère, le genou droit est engorgé, sensible; le 20, l'animal ne peut plus se relever. A partir du 30, la lésion oculaire guérit, la boiterie s'atténue et l'animal se rétablit.

438. — Le 10, boiterie à droite derrière; le 14, éruption de vésico-pustules recouvertes d'une croûte épaisse sur le nez et sur la face; sous les croûtes existe du pus renfermant du streptocoque. Le 3 juillet, on tond ce mouton et on s'aperçoit que l'éruption de vésico-pustules s'est généralisée à toute la surface cutanée; les croûtes s'enlèvent facilement en laissant à leur place des surfaces rosées, circulaires.

439. — Le 5, la paupière inférieure gauche est œdémateuse, fermée, l'œil droit est légèrement louche; le 20, l'œil droit, complètement opaque, est entouré d'un large liséré rouge foncé.

3° Le 11 juillet 1911, une brebis en lactation, 522, reçoit dans le trayon gauche 1 cent. cube de liquide mammaire 510. Le 26, l'œil droit est complètement opaque; le genou gauche est volumineux, chaud, douloureux; le lait du quartier inoculé a une consistance caséeuse, il est peu abondant et sort sous forme de tortillons. Au 20 septembre, les mamelles sont atrophiées.

4° Le 28 novembre 1911, une brebis 521 reçoit dans le trayon droit 2 gouttes obtenues difficilement de la mamelle 510. Le 5 décembre, la base du trayon et le trayon lui-même sont augmentés de volume, de teinte rouge; la mulsion donne 20 cent. cubes de liquide louche, verdâtre, avec tortillons. Le 8, le quartier inoculé est volumineux; le 22, l'œil droit se trouble; le boulet antérieur droit est volumineux, chaud, sensible, l'animal n'appuie plus sur ce membre.

Comme la sécrétion mammaire de la chèvre 510 se tarit complètement, force nous fut d'interrompre nos inoculations; mais cette série d'expériences montre, de la façon la plus nette, que jusqu'au dernier moment, alors que le trayon ne donne plus que difficilement 2-3 gouttes de liquide altéré, celui-ci se montre aussi virulent qu'au début.

Nous le répétons, la chèvre 510, porte-virus, était arrivée au laboratoire le 21 mai, le début de sa maladie remontait au moins à un mois de date et le 28 novembre le liquide de sa mamelle a encore infecté une brebis : sa mamelle a donc cultivé le virus pendant plus de huit mois.

Ce cas n'est pas isolé, et nous pourrions encore rapporter l'histoire d'une brebis 452 dont le liquide mammaire permit d'infecter plusieurs animaux dans l'espace de quelques mois.

Il résulte donc de ces constatations deux faits d'une grande importance pratique :

1° La mamelle agalaxique peut sécréter pendant plusieurs mois un liquide dont la quantité va diminuant lentement jusqu'à ce que la glande soit complètement atrophiée;

2° Ce liquide, à quelque moment de l'évolution de la maladie qu'on le recueille, se montre également virulent.

Il conviendra de tenir compte de ces données dans l'établissement des mesures prophylactiques que l'on devra prendre un jour ou l'autre contre l'agalaxie.

Dissémination du virus dans le milieu extérieur.

Pendant la plus grande partie et souvent la totalité de leur évolution, les localisations agalaxiques restent fermées. Il ne suffit donc pas de laisser des sujets sains cohabiter avec des malades pour voir forcément la contagion s'effectuer; il est indispensable que l'un des malades laisse échapper le virus d'une façon ou d'une autre.

Il est à présumer que lorsque la mamelle est distendue par l'inflammation et l'accumulation du lait altéré, quand des poches suppurantes se forment, que le pus s'écoule après avoir macéré la peau; lorsque les articulations lésées suppurent; lorsque la lésion oculaire va jusqu'à la perforation de la cornée,

le virus agalaxique est largement disséminé sur les aliments et les litières.

Cette condition n'était probablement pas remplie dans les expériences de Valentini, de Hess et Guillebeau, qui ont laissé en vain pendant neuf semaines des chèvres saines au contact de chèvres malades. Par contre, Rocco Marra rapporte le cas d'un troupeau de chèvres qui fut infecté à la suite de l'introduction d'un bouc porteur d'une arthrite suppurée. Les lésions oculaires, en particulier, portent le virus directement au contact des aliments. Nous avons recherché si les larmes s'échappant d'un œil malade, sans perforation, contenaient le virus. Le 25 avril 1912, nous recueillons 2 gouttes de larmes de l'œil gauche d'une brebis 584 ; la lésion oculaire avait débuté le 24 mars, après absorption de virus par les voies digestives ; il n'y a pas eu perforation, mais la cornée est verruqueuse à sa surface; la lésion est en voie de régression. Ces 2 gouttes de larmes, additionnées de 10 cent. cubes de solution physiologique, sont injectées dans le trayon d'une chevrette 594 dont la mamelle ne donne que 1/2 cent. cube de liquide séreux. Le 29, on obtient du trayon inoculé 2 cent. cubes de liquide agalaxique typique, grisâtre, avec petits grumeaux puriformes.

Il y a donc là un mode insoupçonné de dissémination du virus qui rend dangereux tout animal porteur de lésions oculaires, même fermées.

Absorption du virus par les voies digestives.

Il ne semble pas que des recherches systématiques aient été poursuivies par nos devanciers dans le but de constater si, comme la pratique permettait de le supposer, l'infection était réalisable par la seule absorption de produits virulents. Cette expérience avait cependant été tentée, sans résultat, par différents auteurs, Oreste notamment ; elle méritait d'être reprise, car, à plusieurs points de vue, elle offre un intérêt tout particulier.

En effet, tous les modes d'infection par effraction des tissus donnent des résultats positifs; il n'est nullement besoin pour amener l'apparition des localisations mammaires, oculaires ou articulaires de déposer le virus dans l'organe sur lequel on

veut provoquer une lésion. La voie veineuse que nous avons largement utilisée, avec l'injection dans le trayon, nous paraît répondre à tous les desiderata dans la recherche de la virulence d'un produit donné.

On a pu réaliser l'infection en déposant le virus à l'entrée du conduit galactophore (Celli et de Blasi) ou, plus simplement encore, en opérant la traite avec des mains souillées de lait malade.

Mais, en pratique, est-ce bien selon ces différents modes que la contagion s'effectue dans la majorité des cas? Les brebis laitières ne sont pas les seules atteintes, il s'en faut : les agneaux, les mâles adultes et les femelles non lactifères s'infectent également dans la même proportion et, chez eux, naturellement, les localisations ne peuvent apparaître que sur les yeux et les articulations, lésions aussi spécifiques que la mammite agalaxique.

On ne peut accuser les mains des trayeurs que pour les animaux qui sont exploités en vue de la production du lait, et c'est encore l'exception; l'intervention des arthropodes soupçonnée par Celli et de Blasi n'a pu être démontrée expérimentalement.

Nous avons pensé que le véritable mode d'infection se trouvait dans l'absorption du virus par les voies digestives et l'expérimentation, à plusieurs reprises, est venue confirmer nos prévisions.

I. — Le 11 janvier 1912, 3 moutons d'un an, nés au laboratoire, 549, 550 et 551, absorbent sur du son 150 cent. cubes de lait agalaxique provenant de la mamelle de la chèvre 545 (le filtrat de ce lait avait donné une mammite agalaxique à la chèvre 544).

549. — Reste couché le 4 février; il boite fortement du membre postérieur droit qui est soustrait à l'appui. Les deux yeux présentent de l'opacité de la cornée; ils sont entourés d'une large bande rouge foncé, lésion agalaxique typique.

550 et 551. — N'ont présenté qu'un peu de raideur des membres postérieurs.

II. — Le 14 février 1912, 3 vieilles brebis, 563, 564 et 565, absorbent sur du son 50 cent. cubes de lait extrait des mamelles des chèvres 539 et 544.

Le 29, la brebis 564 tient l'œil droit fermé, le bord des paupières est rouge vif et la cornée est louche, surtout à sa périphérie. Le 6 mars, la cornée est complètement opaque avec une belle teinte laiteuse; un large ruban rouge foncé l'entoure.

565. — Avorte le 5 mars. L'avorton, presque à terme, montre des ecchy-

moses à la surface du péricarde et sur le péritoine qui enveloppe la vessie. Les ganglions du flanc, vivement irrités, sont entourés d'une large zone hémorragique. L'urine renferme 1 gramme d'albumine environ.

563. — N'a jamais rien présenté d'anormal.

III. — 4 brebis en état de gestation absorbent le 5, le 7 et le 14 mars, du lait altéré sur leurs aliments (582, 583, 584 et 585).

Deux ne présentent dans la suite aucun symptôme d'infection (582 et 585).

583. — Boite du membre postérieur gauche du 2 au 16 avril et donne, le 27 avril un agneau petit, très peu vigoureux, qui vit cependant mais reste chétif.

584. — Boite du membre postérieur droit le 24 mars; la cornée commence à devenir opalescente. Le 26, la cornée est complètement opaque. Au 7 avril, le membre est toujours soustrait à l'appui; l'animal maigrit beaucoup. Le 12 avril, cette brebis donne un avorton non viable, qui reste étendu abandonné et sans soins par sa mère et meurt le 14. Il présente des hémorragies sous-brachiales et autour des ganglions du flanc; son urine renferme 1 gramme d'albumine par litre. La brebis reste toujours couchée, très maigre.

Ces expériences montrent donc très nettement que le virus peut être absorbé par les voies digestives et provoquer l'apparition des différentes localisations agalaxiques, et cela tout aussi aisément sur des animaux jeunes, en parfait état de santé comme nos moutons de la première série, que chez des brebis usées par l'âge de la deuxième.

L'infection par les voies digestives, si facile à réaliser expérimentalement, nous apparaît comme le mode de transmission de beaucoup le plus répandu dans la pratique. Le virus agalaxique franchit aisément les barrières épithéliales, cultive dans le sang, comme l'ont fait voir Rocco Marra et Nicola Cocciante, et se localise ensuite dans les centres d'élection.

Cette expérience avait encore pour nous une importance capitale, elle nous permettait d'infecter les animaux sans avoir recours à l'effraction des tissus, dans nos essais d'immunisation, et les expériences avaient, de ce chef, une véritable portée pratique.

D'autres chercheurs n'ont, avant nous, obtenu aucun résultat dans leurs essais de transmission de l'agalaxie par les voies digestives.

Nous ne voyons d'autre explication à ces résultats négatifs que l'emploi d'animaux d'expériences en trop petit nombre, ou ayant acquis l'immunité par une atteinte antérieure de la maladie. Nous pouvons même admettre que ces animaux se sont infectés sans présenter de symptômes cliniques, ce qui a fait croire à la non-contagion.

Il convient, en effet, d'utiliser un assez grand nombre de sujets; quelques-uns paraissent échapper à l'infection, car on ne constate chez eux aucun symptôme bien net.

Première série. — 3 sujets (moutons d'un an), un seul 449, présente des lésions oculaires; les deux autres, de la raideur à peine sensible et fugace des membres postérieurs;

Deuxième série. — 3 sujets (vieilles brebis distomateuses); une présente des lésions oculaires (564); une autre avorte (563);

Troisième série. — 4 sujets (brebis en état de gestation); une fait de l'arthrite (683); une autre de la kératite, de l'arthrite et donne un avorton (584).

Ainsi un certain nombre d'animaux qui ont absorbé du virus paraissent échapper à l'infection. Parmi ceux-ci, il en est qui, bien que n'ayant rien montré d'anormal, ont cependant subi une légère atteinte de la maladie, car, inoculés cinq à six semaines après le repas infectant, même avec une très forte dose de virus, ils se montrent insensibles; ils ont acquis l'immunité.

On peut nous objecter que ces animaux étaient peut-être doués d'une immunité naturelle avant l'expérience : nous ne le pensons pas.

Tous nos animaux d'expériences, nous le répétons, sont nés au laboratoire ou proviennent d'exploitations du centre de la France, parfaitement à l'abri de l'agalaxie; tous se sont montrés sensibles aux autres modes d'infection par effraction des tissus.

D'autres sujets, consommant des repas infectants, ne contractent pas la maladie, même sous une forme bénigne, et sans symptômes cliniques appréciables.

Une brebis 580, après trois repas infectants en dix jours, le 5, le 7 et le 14 mars, est éprouvée le 27 avril avec 1 cent. cube de lait agalaxique dans le muscle. Le 4 mai, cette brebis présente de la raideur générale, de la sensibilité des articulations et reste couchée dans un coin de la loge; elle n'avait donc pas acquis l'immunité.

Les nos 550, 551, 563 et 565, qui n'avaient jamais présenté de signes bien confirmés d'infection après ingestion de lait altéré, reçoivent dans les muscles de la cuisse 5 cent. cubes de sérosité pleurale de la brebis 588 (cette sérosité avait donné une belle mammite agalaxique à la chèvre 591) : les nos 582 et 585 qui se trouvaient dans le même cas reçoivent dans la veine 20 cent. cubes du lait de la chèvre 591.

Aucun de ces animaux n'a réagi à la suite de cette sévère épreuve.

Ainsi, expérimentalement, on retrouve ce que l'on constate dans la pratique, un pourcentage plus ou moins élevé d'animaux contractant la maladie sous ses différentes formes et avec ses diverses localisations; d'autres acquièrent l'immunité par une atteinte bénigne; d'autres, enfin, restent plus ou moins longtemps indemnes, mais toujours sous la menace de la contagion.

Nous ferons observer que jamais, dans la maladie naturelle, les sujets d'un troupeau infecté n'absorbent des doses aussi élevées de virus que celles distribuées à nos animaux d'expériences, aussi voit-on la contagion se faire parfois très lentement, ne frappant que le tiers ou la moitié de l'effectif dans l'espace de quelques mois. Il est probable que le mauvais entretien des troupeaux, à tous les points de vue, les rend plus vulnérables, même à des doses incomparablement plus faibles de produits virulents.

On retrouve dans l'agalaxie, comme dans toutes les infections du mouton, l'influence néfaste de l'encombrement et de l'hygiène défectueuse, c'est une banalité de le répéter.

Les agneaux.

Les brebis qui contractent la maladie pendant la gestation avortent, donnent des mort-nés ou des monstres (Celli et de Blasi); l'infection peut passer de la mère au fœtus et celui-ci présente à sa naissance des lésions caractéristiques (Labat). Nous avons eu l'occasion de faire quelques autopsies d'agneaux chétifs, non viables, véritables avortons, nés au laboratoire de mères ayant contracté l'agalaxie expérimentalement par les voies digestives, deux ou trois semaines avant la mise-bas.

Les lésions, assez discrètes, consistaient en une vive irritation des ganglions, ceux du flanc notamment, entourés d'une zone hémorragique, en plaques congestives plus ou moins étendues sur le péricarde et le péritoine.

Dans tous les cas (3), l'urine renfermait environ 1 gramme d'albumine par litre.

Quand les agneaux naissent viables, ils meurent rapidement de faim si leur mère a les mamelles infectées; s'ils vivent, ils se contaminent presque fatalement : la localisation de beaucoup la plus fréquente est l'arthrite.

Il semble que les jeunes animaux, agneaux et chevreaux, sont moins sensibles à l'agalaxie que les adultes; les boiteries sont en général peu graves et disparaissent assez rapidement, c'est, du moins, ce que nous avons constaté au laboratoire. Il est vrai de dire que l'on peut rencontrer cependant de très jeunes animaux porteurs d'arthrites volumineuses, avec hydropisie des gaines et fragments de cartilages dans la séreuse, remplie de synovie plus ou moins teintée.

Nos brebis hyperimmunisées ont donné elles aussi quelques agneaux : les uns sont morts dès la naissance, les autres, éprouvés une quinzaine de jours après l'accouchement avec une forte dose de virus, n'ont jamais présenté le moindre signe d'infection. Il est à croire que leur immunité est en rapport avec celle de leurs mères.

Nous avons constaté d'une façon très nette que les mères mettant bas au début de l'infection donnaient encore des agneaux vigoureux et de taille normale; mais si l'accouchement s'effectue après un temps plus ou moins long au cours de la maladie déclarée, on n'obtient plus que des jeunes chétifs, très maigres, puis des avortons non viables et enfin des mort-nés de taille encore plus réduite (expérience comportant 14 brebis en état de gestation).

Ces faits confirment, expérimentalement, ce qu'avaient déjà constaté dans la pratique MM. Celli et de Blasi.

Création d'une source abondante de virus pur.

On rencontre, dans l'étude expérimentale de bon nombre d'affections à virus filtrant non cultivables *in vitro*, les plus grandes difficultés pour obtenir le virus à l'état pur, sous une forme maniable et en quantité assez grande pour permettre de tenter l'hyperimmunisation et obtenir ainsi un sérum spécifique.

La sécrétion de la mamelle agalaxique est parfois assez abondante, mais, pratiquement, le liquide recueilli est le plus souvent, malgré les précautions prises, souillé de germes ayant cultivé dans la mamelle ou se mélangeant au liquide à son passage dans le trayon. Ces impuretés, bien qu'à l'état d'unités, au début de la maladie tout au moins, ne sont pas sans incon-

vénients, bien que nous ayons pu injecter dans la veine de fortes quantités de liquide mammaire sans accidents graves immédiats ou éloignés. Le produit de broyage des cornées malades est, lui aussi, fatalement impur, on le conçoit facilement, à un plus haut degré encore que le liquide mammaire.

Enfin, si la sérosité articulaire peut être récoltée aseptiquement, sa quantité n'atteint que tout à fait exceptionnellement quelques centimètres cubes.

Étant donné que le virus agalaxique cultive localement dans l'organisme, avant sa généralisation, comme la clavelée, par exemple, nous avons pensé que le procédé utilisé avec succès par Borrel pour cette maladie, procédé qui consiste à créer expérimentalement un abondant exsudat par l'injection de gluten-caséine dans la plèvre, serait susceptible de nous procurer le virus pur en grande quantité.

Ayant eu l'occasion de récolter de la mamelle d'une brebis agalaxique depuis peu, à la ferme de M. B..., près de Malijai (Basses-Alpes), un liquide d'une limpidité presque parfaite après le dépôt des grumeaux au fond du vase, nous n'avons pas hésité à l'injecter, mélangé au gluten-caséine, dans la plèvre d'une brebis neuve.

La stérilité absolue de ce liquide était, bien entendu, problématique, et nous avions l'appréhension de n'obtenir qu'une pleurésie purulente à staphylocoques ou à streptocoques; cependant nous avions déjà constaté à maintes reprises qu'il était possible d'ensemencer assez largement du lait agalaxique sans obtenir aucun développement.

Le résultat de cette expérience fut des plus heureux. Le 3 février 1912, une brebis 559 reçoit dans la plèvre droite 250 cent. cubes de liquide Borrel, auquel on a ajouté 5 cent. cubes de liquide mammaire recueilli l'avant-veille à Malijai.

Au bout de quarante-huit heures, la respiration s'accélère et paraît gênée; l'animal est assez triste; il mange cependant volontiers et rumine normalement.

Le 10 février, sept jours après l'injection, la brebis 559 est sacrifiée. La plèvre droite renferme 2 litres et demi environ de sérosité jaune, un peu verdâtre et louche; d'abondantes productions spongieuses, gorgées de sérosité, ont pris la place du poumon qui est complètement rétracté.

Cette sérosité, largement ensemencée en bouillon sérum, se montre stérile.

Dans le but de contrôler la virulence de l'exsudat pleural provoqué expérimentalement, nous avons injecté, à plusieurs animaux, par des voies différentes, des doses variables de liquide pleural. Ces inoculations de contrôle n'ont débuté qu'au troisième passage par la plèvre, pour être sûr que le produit injecté était bien une culture *in vivo* et non une simple dilution du virus primitivement inoculé.

Comme les courbes le montrent, il n'y a pour ainsi dire pas d'incubation ; la température commence à monter quelques heures après l'injection dans la plèvre : la culture est donc extrêmement rapide.

I. — Le 24 février, une brebis 569 reçoit dans la veine 15 cent. cubes de sérosité pleurale de la brebis 562 (3e passage). Le 10 mars, la cornée commence à se troubler; le 15, elle est complètement opaque, jaunâtre à sa périphérie, bleutée en son centre, entourée d'une zone rouge foncé. Le 17, boiterie du membre antérieur droit. Cette brebis, dont l'état est de plus en plus précaire, est sacrifiée le 22 mars.

II. — Le 2 mars, une chèvre 587 reçoit dans le trayon droit 1 cent. cube de sérosité pleurale de la brebis 568 (4e passage). Le 7, le lait commence à s'altérer, il est plus jaune et plus crémeux que celui du trayon gauche et renferme quelques fins grumeaux. Dans la suite, le liquide recueilli prend tous les caractères du lait agalaxique et diminue de quantité. Au 18, la sécrétion est complètement tarie : la chèvre reste étendue sans mouvements sur le côté. On la sacrifie le 22 mars. L'urine renferme 0 gr. 75 d'albumine ; la mamelle est sclérosée, le sinus droit contient une masse puriforme, consistante, jaunâtre, sans microbes au microscope. Les articulations huméro-radiale gauche, fémoro-tibiale droite et gauche, présentent dans leur cavité une masse fibrineuse en voie d'organisation.

III. — Le 9 avril, une chèvre 591 reçoit dans le trayon gauche 1 cent. cube de sérosité pleurale de la brebis 588 (5e passage). Le 12, le quartier inoculé est volumineux, chaud, mais pas très sensible ; il donne 100 cent. cubes de lait plus aqueux et plus blanc que celui du quartier droit, qui est plus jaune et crémeux.

IV. — Le 27 avril, un agneau de deux mois, 605, reçoit sous la peau de la cuisse droite 1 cent. cube de sérosité pleurale de la brebis 593 (7e passage). Le 5 mai, le membre antérieur gauche est soustrait à l'appui ; le 7, l'animal reste couché et se déplace difficilement; le 10, l'œil droit est maintenu fermé, des larmes abondantes s'en échappent; le 19, la cornée est complètement opaque avec un large liséré rouge foncé.

V. — Le 17 mai, une chèvre 620 reçoit dans le trayon droit 1/10 de cent. cube de liquide pleural du mouton 615 (9e passage). Le 23, le trayon inoculé donne d'abondants tortillons sans liquide; le trayon gauche s'infecte également dans la suite.

Ces exemples suffisent à établir qu'une véritable culture de virus agalaxique s'opère dans l'exsudat pleural provoqué. Comme chaque animal nous donnait en moyenne 500-800 cent. cubes de sérosité virulente, nous étions en mesure de tenter l'obtention d'un sérum immunisant sur un certain nombre de chèvres et de brebis.

Hyperimmunisation.

Les animaux destinés à la production du sérum furent choisis parmi nos sujets guéris de la maladie spontanée ou expérimentale. Nous avons peu de chose à noter au cours de l'immunisation.

Quinze jours après la dernière injection, les animaux sont saignés une première fois, puis une seconde, huit jours après la première.

Le matériel virulent se composait, au début, de lait agalaxique ; dans la suite, nous avons utilisé presque exclusivement la sérosité pleurale.

Toutes les injections, soit sous la peau, soit dans la veine, furent remarquablement bien tolérées et espacées de huit jours en huit jours. L'injection de liquide agalaxique dans les veines provoque parfois un peu d'essoufflement passager ; encore peut-on retarder l'apparition de ces troubles en inoculant le liquide dans la saphène au lieu de la jugulaire.

De la vaccination.

MM. Celli et de Blasi, les premiers, en 1906, ont tenté de vacciner en utilisant le filtrat de lait agalaxique chauffé pendant une heure à 40-45 degrés. Il ne semble pas que le procédé ait subi victorieusement l'épreuve de la pratique.

Ce que nous savons des quelques virus filtrants que nous avons eu l'occasion d'étudier personnellement depuis une dizaine d'années et les résultats négatifs obtenus par d'autres dans des affections variées ne nous a pas engagé à tenter le moindre essai dans cette voie.

Les différentes méthodes d'atténuation, qui donnent de si merveilleux résultats dans certaines maladies microbiennes, sont tenues en échec par les virus filtrants.

Nous avons de suite porté nos efforts vers l'obtention d'un sérum avec l'intention de l'utiliser, concurremment avec le virus, virus aussi fixe et aussi exalté que possible.

La réalisation de l'exsudat pleural virulent nous fournissait tous les facteurs de ces recherches.

Dès le mois de décembre 1911 nous entreprenions l'hyperimmunisation de nos animaux et, en février, jugeant leur état convenable, nous commencions nos expériences de contrôle de la valeur de leur sérum contre un virus doué d'une haute activité.

Essai préventif du sérum.

Le 28 février 1912, nous injectons sous la peau de la cuisse de 6 brebis des doses variables de sérum ; le lendemain, nous inoculons à chacun de ces 6 animaux et à 2 autres servant de témoins, la forte dose de 2 cent. cubes de lait agalaxique *dans les muscles* de la cuisse droite, épreuve extrêmement sévère (nos 570, 571, 572, 573, 574, 575. Témoins 576 et 577).

570. — Reçoit 1 cent. cube de sérum. Boite du membre antérieur droit le 13 mars ; le genou est volumineux et sensible. Elle donne le 7 avril un agneau chétif qui meurt au bout de vingt-quatre heures, bien que sa mère ait du lait en abondance. L'état général est très mauvais ; elle se rétablit dans la suite.

571. — Reçoit 2 cent. cubes de sérum. Boite du membre antérieur gauche le 9 mars. A partir du 26 mars, reste constamment couchée, les deux genoux sont très volumineux. Vers le 15 avril, elle se tient sur les genoux pour manger ; son état général est mauvais. Au 20 mai, elle est d'une grande maigreur. Elle se rétablit lentement dans la suite.

572. — Reçoit 5 cent. cubes de sérum. Boite du membre postérieur droit le 13 mars. A partir du 26 avril, elle ne boite plus. L'état général est conservé satisfaisant.

573. — Reçoit 10 cent. cubes de sérum. Boite du membre antérieur droit du 21 au 29 mars. État général satisfaisant.

574. — Reçoit 15 cent. cubes de sérum. Boite pendant quarante-huit heures du membre antérieur gauche.

575. — Reçoit 20 cent. cubes de sérum. Ne montre absolument rien d'anormal.

Des deux témoins, l'un, 576, boite du membre antérieur gauche le 11 mars : à partir du 13, reste couché et meurt le 22 mars ; l'autre, 577, boite du membre antérieur droit le 11 mars, et meurt le 15 mars.

L'épreuve avait été sévère puisque les deux témoins sont morts quinze jours et trois semaines après l'injection de virus. Aucun des traités n'a succombé, ce qui a une certaine importance ; de plus, il est facile de constater que la gravité de la maladie et la durée des lésions locales s'atténuent avec les doses

croissantes de sérum : 20 cent. cubes ont complètement protégé.

Il était inutile d'éprouver dans la suite l'immunité des nos 570, 571, 572, 573 et 574, qui avaient manifestement été infectés. Mais, le 20 avril, plus d'un mois et demi après l'injection de sérum et de virus, alors qu'il était permis de penser que l'action protectrice du sérum avait disparu, nous avons injecté 20 cent. cubes de lait agalaxique (chèvre 591) dans la jugulaire de la brebis 575, qui n'avait montré aucun signe d'infection. Cet animal ne parut nullement être incommodé par cette nouvelle épreuve très sévère, ce qui nous autorise à croire qu'elle avait acquis une solide immunité active à la suite de la première inoculation de virus du 29 mars.

Action préventive du sérum

(*Sérum sous la peau, virus par les voies digestives.*)

On utilise un lot de 8 brebis en état de gestation. Les nos 578 et 579 reçoivent sous la peau 10 cent. cubes de sérum; les nos 580 et 581, 20 cent. cubes le 5 mars 1912.

On leur adjoint 4 autres brebis témoins : nos 582, 583, 584 et 585. Ces 8 animaux font le 5, le 7 et le 14 mars un repas infectant composé de son arrosé de lait agalaxique. Les traités reçoivent une deuxième injection de sérum aux mêmes doses le 17 mars.

Aucune des brebis traitées n'a présenté de symptômes quelconques d'infection.

Parmi les témoins, deux (nos 582 et 585) n'ont pas présenté de symptômes cliniques. 583 boite du membre postérieur gauche le 2 avril et donne, le 27, un agneau chétif qui vit cependant. 584 boite du membre postérieur droit; le 24 mars, sa cornée gauche commence à se troubler ; le 26, l'œil est complètement louche; le 7 avril, l'appui du membre postérieur est toujours supprimé ; la brebis maigrit beaucoup. Elle donne, le 12 avril, un avorton qui meurt au bout de 48 heures. Au mois de mai, l'animal boitait toujours et son état était très précaire.

Là encore l'action préventive du sérum fut très nette, puisque les quatre traités restèrent indemnes et que deux témoins sur

quatre présentèrent des localisations. Comme dans nos précédentes expériences sur l'infection par les voies digestives, nous avons éprouvé les deux témoins (582 et 585) qui n'avaient pas montré de localisations, en leur injectant dans la jugulaire à chacun 20 cent. cubes de lait agalaxique, le 22 avril. Cette sévère épreuve fut parfaitement tolérée. Le 22 avril également, nous avons éprouvé les quatre brebis traitées en leur injectant dans le muscle à chacune 1 cent. cube de lait agalaxique. Trois (578, 579 et 581) ne montrèrent rien d'anormal dans la suite; par contre, 580 s'infecte. Le 4 mai, elle présente de la raideur des quatre membres, puis elle reste couchée la plupart du temps. Cependant elle se rétablit assez rapidement.

Pour celle-là, l'action protectrice du sérum avait donc disparu au bout de un mois environ.

Le résultat le plus net de ces expériences fut qu'il était possible de vacciner activement par l'emploi du sérum et du virus. Nous avons donc réalisé l'expérience suivante afin de savoir quelles doses respectives de sérum et de virus il convenait d'utiliser pour obtenir l'immunité sans risquer de donner la maladie.

Mélange extemporané de virus et de sérum sous la peau.

Le virus utilisé fut la sérosité pleurale de la brebis 593 (7e passage), 27 avril 1912. Les moutons 601 et 602 reçoivent un mélange de 1/5 de cent. cube de virus avec 5 cent. cubes de sérum; 603 et 604 reçoivent 1/2 cent. cube de virus avec 5 cent. cubes de sérum; agneau 605 et mouton 606 reçoivent 1 cent. cube de virus avec 5 cent. cubes de sérum. Les témoins 600 et 600 *bis* reçoivent respectivement 1 cent. cube et 1/5 de cent. cube de virus. L'injection fut faite à tous sous la peau de la cuisse droite.

Cette expérience faillit être nulle par suite du décès précoce des deux témoins : 600 fut trouvé étranglé dans le râtelier, 600 *bis* mourut d'une pleurésie purulente à la suite d'une fistule profonde au niveau du sternum nécrosé, lésion qui avait passé inaperçue. Fort heureusement l'agneau 605, qui avait reçu 1 cent. cube de virus et 5 cent. cubes de sérum, fit voir que le mélange, bien supporté cependant par les autres animaux du lot adultes, qui ne présentèrent aucun signe d'infection, était cependant dangereux pour un sujet jeune, car, dès le 5 mai, son membre antérieur gauche est soustrait à l'appui;

le 7, il reste couché dans un coin; le 10, l'œil droit est fermé, le bord des paupières est rouge; le 19, la cornée, complètement opaque, est entourée d'un large ruban rouge foncé.

Le 22 mai, trois semaines après l'injection vaccinale, chacun des moutons 601, 602, 603, 604 et 606 reçoit dans les muscles de la cuisse 1/2 cent. cube de lait agalaxique 591 et 594, récolté au moment de l'inoculation.

Aucun de ces animaux ne présente dans la suite le moindre symptôme d'infection.

Par contre, une chèvre, qui avait reçu 2 gouttes du même lait dans le trayon droit, fit une belle mammite agalaxique.

Prophylaxie.

Les conditions dans lesquelles se conserve et se propage le virus agalaxique sont suffisamment connues, actuellement, pour permettre de tracer les règles d'une prophylaxie qui pourrait être efficace.

Le virus se conserve des mois entiers, nous l'avons démontré, dans la mamelle lésée; c'est donc contre les femelles présentant de la mammite agalaxique que les mesures les plus sévères devront être prises. La recherche de ces porte-virus est facile dans la majorité des cas : les noyaux indurés de la glande, l'aspect si spécial du liquide qu'elle sécrète ne laissent guère de place à une erreur de diagnostic. Ces animaux seront irrévocablement sacrifiés.

L'isolement, pour ceux qui sont porteurs de lésions fermées, permettra leur engraissement toujours long cependant, avant leur envoi à la boucherie. Par contre, ceux qui présentent des lésions ouvertes (arthrites suppurées) ou des lésions oculaires, étant dangereux au premier chef, seront également abattus dans le plus bref délai.

La désinfection des mains des personnes chargées de la traite serait une excellente mesure à prendre en tout temps. La désinfection totale des étables et la séquestration, momentanée tout au moins, du troupeau infecté, jusqu'à ce qu'il se soit écoulé un mois depuis l'apparition du dernier cas, protégeraient les troupeaux voisins. Tout cela, en somme, serait assez simple, mais il faut compter avec les difficultés inhérentes au mode d'entretien du mouton qui rendraient ces mesures parfaitement illusoires, étant donnée la chronicité de l'affection. Nous augu-

rons mieux de l'emploi de la sérothérapie et de la séro-vaccination.

Des expériences sont entreprises dans cette voie; nous espérons être en mesure, avant peu, de donner des indications précises sur les résultats obtenus dans la pratique avec l'une et l'autre de ces méthodes.

Conclusions.

En plus des quelques observations personnelles d'importance relative que nous avons relatées dans notre exposé clinique, voici ce que nos recherches nous ont permis de conclure :

1° Contrairement à l'opinion d'auteurs autorisés, la mamelle agalaxique peut sécréter pendant plusieurs mois, jusqu'à son atrophie totale, un liquide doué d'une égale virulence pendant tout le cours de la maladie;

2° Pour que la contagion s'opère, il paraît indispensable que les malades soient porteurs de lésions ouvertes : les larmes de l'œil lésé, même sans ulcération, sont virulentes;

3° Le virus agalaxique est parfaitement absorbé par les voies digestives et ce mode d'infection semble de beaucoup le plus important dans l'étiologie de l'agalaxie;

4° Il est possible de créer une source abondante de virus pur en provoquant un exsudat pleural expérimental;

5° Le sérum des animaux hyperimmunisés est doué de propriétés préventives très nettes;

6° La séro-vaccination, réalisée au laboratoire, paraît devoir rendre de grands services dans la prophylaxie de l'agalaxie.

L'éloignement du laboratoire des centres infectés aurait rendu nos recherches particulièrement longues et laborieuses si nous n'avions trouvé près de nos confrères le concours le plus empressé. A MM. Arlaud, vétérinaire départemental des Basses-Alpes, M. Scoffié, vétérinaire départemental des Alpes-Maritimes, M. Pleindoux, vétérinaire départemental de la Vaucluse, M. Allègre, vétérinaire à Oraison, et M. Eyriès

jeune, vétérinaire à Carpentras, nous adressons l'expression de toute notre gratitude.

Notre ami M. Monvoisin, chef des travaux de chimie à l'Ecole d'Alfort, a bien voulu mettre à notre disposition sa compétence toute spéciale pour l'analyse du lait agalaxique, nous l'en remercions très cordialement.

MM. les professeurs Hess et Guillebeau, de l'École vétérinaire de Berne, ont eu la grande amabilité de nous autoriser à reproduire les remarquables planches en couleurs de leur mémoire; nous les prions d'agréer nos bien sincères remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

1. Metaxa. — *Delle malattie contagiose epizootiche degli animali domestici*, 1816-1817.

2. Zangger. — Die Galti als Seuche bei den Ziegen. *Schweiger Archiv für Thierheilkunde.* Neue folge, t. XIII, p. 348.

3. Brusasco. — Due parole intorno ad una forma di agalassia. *Il medico veterinario,* 1871, p. 241, et *Journal de médecine vétérinaire*, 1885, p. 543.

4. Rocco Marra. — *Agalassia contagiosa. Il moderno zooiatro*, 1891, p. 425.

5. Barthélemy. — Rhumatisme arthritique. *Journal de médecine vétérinaire*. 1894, p. 276.

6. Schossleitner. — Ein Beitrag zur infectiösen Agalactie der Ziegen. *Thierärztl. Centralblatt*, 1895, p. 445.

7. Hess et Guillebeau. — Ueber infectiöse Agalactie bei Ziegen. *Landwirtschaft. Jahrbuch*, t. VII, 1893, et brochure avec 6 planches coloriées.

8. Oreste. — *Bollettino delle notizie agrarie,* 1882. — *Malattia del bestiame ovino della provincia di Aquila. Sulla pretesa contagiosa della Stornarella o Asciuttarella*, 1886.

9. Oreste et Marcone. — Mal del sito. *Atti del R. Istituto d'incorag. di Napoli*, t. V (Ser. 4), 1892, et brochure *Annali di Agricoltura*, n° 210, 1896, p. 30.

10. Bournay. — L'agalaxie infectieuse. *Rev. véter.*, 1896, p. 65.

11. Valentini. — *Communic. al Collegio dei Zooiatri in Roma.* Tornata del 24 marzo 1903.

12. Celli et de Blasi. — Etiologia dell' agalassia contagiosa delle pecore e capre. *Annali d'Igiene sperimentale*, anno 1906, fasc. II. — *Prime esperienze di vaccinazione contro l'agalassia contagiosa delle pecore e capre*, brochure, Milan, 1906.

13. Rocco Marra et Nicola Coccianté. — Etude expérimentale de l'agalaxie contagieuse des ovins et des caprins. *Giornale della R. Società nazionale veter.*, 13 et 20 avril 1912.

14. H. Carré. — Le Mal de Lure. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1er mai 1912.

EXPLICATION DES PL. XXI A XXIII

PL. XXI. — Fig. 1. — *Œil droit.* — A, conjonctive palpébrale; B, conjonctive cornéenne; C, bord brun foncé de la cornée; D, iris; E, moitié supérieure de la cornée (par transparence) traversée par de gros vaisseaux; F, granulations hypertrophiques; G, pigmentation de la moitié inférieure de la cornée.

Fig. 2. — *Œil gauche.* — A, conjonctive palpébrale; B, conjonctive cornéenne; C, bord brun foncé de la cornée; D, iris (par transparence); E, pupille (par transparence); F, foyer inflammatoire de la cornée avec centre blanc et bords à pigmentation foncée. Quelques vaisseaux, venant des bords inférieur et supérieur de la sclérotique, se rendent au foyer inflammatoire.

PL. XXII. — Fig. 1. — *Œil droit.* — A, conjonctive palpébrale; B, conjonctive cornéenne avec dilatation des gros vaisseaux; C, bord brun de la cornée; D, zone vasculaire de la cornée; E, pupille (par transparence); F, foyers circulaires de kératite parenchymateuse; G, dégénérescence suppurative de quelques-uns de ces foyers.

Fig. 2. — *Œil gauche.* — A, conjonctive palpébrale; B, conjonctive cornéenne; C, bord brun de la cornée; D, zone vasculaire de la cornée; E, zone de kératite parenchymateuse intense.

PL. XXIII. — Fig. 1. — *Œil droit.* — A, conjonctive palpébrable; B, conjonctive cornéenne avec dilatation des vaisseaux; C, bord brun de la cornée; D, iris; E, pupille; F, foyer inflammatoire vascularisé de la cornée. Quelques gros vaisseaux venant du bord de la sclérotique traversent la moitié supérieure de la cornée et s'étendent jusqu'au foyer inflammatoire. De nombreux petits vaisseaux courent, parallèlement les uns aux autres, pour se rendre du bord inférieur de la sclérotique au foyer inflammatoire.

Fig. 2. — *Œil gauche.* — A, conjonctive palpébrale hyperémiée; B, conjonctive cornéenne vascularisée; C, bord brun foncé de la cornée; D, iris; E, pupille; F, foyer horizontal non vascularisé de kératite parenchymateuse dans la zone de la fente palpébrale.

ÉTUDE DES CORPUSCULES DE NEGRI
ET DES
FORMATIONS SPÉCIALES A LA RAGE A VIRUS FIXE

par Y. MANOUÉLIAN

(Avec les Pl. XXIV et XXV.)

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Déjà en 1902, sur le conseil du Dr Roux, nous avions entrepris l'étude histologique des ganglions cérébro-spinaux et sympathiques dans la rage des rues et dans la rage à virus fixe (1).

Pour nos recherches, nous avions employé des fixateurs différents : particulièrement le sublimé à l'alcool acétique de Gilson, le sublimé de von Lenhossek, le liquide de Zenker, le liquide de Flemming.

En mordançant les coupes provenant des pièces fixées par les mélanges au sublimé avec des solutions chromiques faibles, ou encore mieux au liquide de Flemming, puis en les traitant par la méthode au magenta et au picro-indigo-carmin, nous avions pu constater dans le cytoplasme des ganglions cérébro-spinaux et sympathiques, des corpuscules colorés en rouge, de forme et de dimension variables, présentant une structure spéciale. Nous avions considéré ces corpuscules comme des produits de désintégration cellulaire.

En 1903, Negri, appliquant la méthode de Mann, a mis en évidence dans les centres nerveux et surtout dans la corne d'Ammon des animaux atteints de rage des rues, des corpuscules particuliers, se colorant en rouge, polymorphes, souvent mûriformes, corpuscules considérés par lui et par nombre d'auteurs comme les parasites spécifiques de la rage.

Peu après le travail de Negri, nous avons étudié, avec la méthode de Mann, les corpuscules de Negri dans les centres nerveux des animaux atteints de rage des rues. Nous avons constaté qu'ils étaient surtout abondants dans la corne

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, p. 113, 24 janvier 1903.

d'Ammon. De plus, nous avons vu des corpuscules encore plus petits que ne l'avait signalé Negri. Nous avons pu nous convaincre aussi que les corps dont nous avions constaté la présence dans les cellules nerveuses des ganglions cérébro-spinaux et sympathiques des animaux rabiques, n'étaient autres que ceux décrits par Negri.

La découverte du savant italien est d'une importance capitale pour le diagnostic de la rage des rues ; mais avant d'aller plus loin, nous allons décrire la technique suivie par nous pour la préparation des corps de Negri dans la rage des rues, ainsi que celle employée pour la mise en évidence des corpuscules décrits par nous dans la rage à virus fixe.

Technique.

Comme fixateurs, nous citerons : le formol à 10 p. 100, le liquide de Zenker et surtout le sublimé à alcool acétique de Gilson, le sublimé de von Lenhossek et le formol picrique de Bouin, qui nous ont donné d'excellents résultats. Les pièces doivent être incluses à la paraffine.

Si l'on est pressé, on doit se servir d'acétone iodé : on enlève, à l'aide de ciseaux très fins, de très minces tranches de cornes d'Ammon et on les immerge dans le mélange suivant :

Acétone à 56-58 degrés.	50 cent. cubes.
Teinture d'iode.	6 gouttes.

Trente minutes après, on renouvelle l'acétone qui, cette fois, ne doit pas contenir d'iode, et on procède, un quart d'heure après, à l'inclusion à la paraffine, qui peut ne durer que trente minutes et même moins. On peut en deux heures obtenir des préparations suffisantes pour le diagnostic.

Les coupes doivent être colorées par la méthode de Mann. Voici comment nous conseillons de procéder :

1° Colorer les coupes de quinze minutes à deux heures à 38-40 degrés, dans le mélange suivant, préalablement porté à la même température :

Solution aqueuse de bleu de méthyle (ne pas confondre avec le bleu de méthylène!) à 1 p. 100.	35 cent. cubes.
Solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100. . . .	45 —
Eau distillée.	100 —

2° Laver rapidement et soigneusement à l'eau de fontaine ;
3° Déshydrater les coupes à l'alcool absolu;
4° Faire agir la solution suivante :

Alcool absolu.	30 cent. cubes.
Solution de soude caustique à 1 p. 100. . .	10 gouttes.

Attendre jusqu'à ce que les coupes deviennent rouges ;

5° Laver à l'alcool absolu, afin d'enlever toute trace de soude caustique;

6° Plonger dans l'eau ordinaire; des traînées rougeâtres quittent les coupes qui deviennent bleuâtres;

7° Plonger dans l'eau acidulée par l'acide acétique : 2 gouttes d'acide dans 40 cent. cubes d'eau. Immédiatement les coupes deviennent bleues. Attendre une minute.

Déshydrater les coupes par l'alcool absolu, éclaircir au xylol et monter au baume *acide*. (Le baume acide se prépare en dissolvant le baume de Canada dans du xylol préalablement saturé d'acide salicylique.)

En suivant à la lettre cette méthode, moins compliquée qu'elle ne paraît au premier abord, on est sûr d'obtenir d'excellents résultats. Dans les préparations traitées avec les fixateurs précédents (exceptons-en le liquide de Zenker), le fond est coloré en bleu, les noyaux des cellules névrogliques en bleu plus foncé ou bleu violet; le cytoplasme des cellules nerveuses est en bleu assez pâle, le nucléole en bleu foncé ou bleu violacé et les autres granulations nucléaires apparaissent en bleu un peu moins accentué que le nucléole. Seuls les corpuscules de Negri sont colorés en rouge dans la cellule nerveuse. Le liquide de Zenker fixe bien le tissu nerveux, mais souvent le nucléole des cellules nerveuses se colore en rouge aussi, et la différenciation est moins nette dans ce cas.

On peut avoir de bonnes préparations des corpuscules de Negri en se servant de la thionine phéniquée, du bleu polychrome de Unna ou encore, simplement, d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de bleu de toluidine : il faut opérer de la manière suivante :

1° Colorer les coupes pendant deux minutes, avec l'un des réactifs ci-dessus;

2° Laver rapidement et soigneusement à l'eau;

3° Différencier avec le mélange :

Glycérine-éther de Unna.	2 cent. cubes.
Alcool à 90 degrés.	100 —

Alcool absolu, xylol baume *neutre*.

Le cytoplasme des cellules nerveuses est presque incolore, le noyau est d'un bleu intense et les corpuscules de Negri d'un bleu azur parsemé de points bleu foncé.

En moins d'une heure on peut obtenir des préparations des corps de Negri rivalisant avec les meilleurs coupes en procédant de la manière suivante :

1° Faire des frottis de corne d'Ammon rabique;
2° Fixer immédiatement à l'acétone iodé pendant quelques minutes;
3° Laver à l'acétone pur ou à l'alcool absolu pendant quelques secondes;
4° Laver à l'eau courante pendant une minute;
5° Colorer avec le liquide de Mann pendant un quart d'heure, à chaud, et différencier comme nous avons indiqué précédemment.

Cette méthode peut rendre service à ceux qui désirent obtenir rapidement une réponse.

Pour peu qu'on soit exercé, on ne confondra pas les corpuscules de Negri extra-cellulaires avec les globules rouges. D'ailleurs, il y a dans les frottis un assez grand nombre de cellules nerveuses contenant des corpuscules.

Ce que nous venons de dire précédemment s'applique à l'étude de la rage des rues. Or, en 1906 (1), nous avons décrit des corpuscules particuliers fort minuscules, en nombre prodigieux, dans la rage à virus fixe (voir leur description plus loin). C'était la première fois qu'on y signalait de pareils corpuscules ; et il n'existe, du moins à notre connaissance, aucune maladie nerveuse où l'on rencontre de pareils éléments. Comme depuis cette époque aucun auteur n'a confirmé leur existence, nous donnerons cette fois-ci quelques détails de technique qui permettront aux chercheurs de les mettre en évidence.

Ce sont les fixateurs à base de sublimé, surtout le sublimé à alcool acétique de Gilson et le sublimé de von Lenhossek, qu'il faudra choisir. Le formol picrique donne de bons résultats aussi. Quant à l'inclusion, elle demande des soins particuliers. On sait, en effet, combien est désastreuse l'inclusion à la paraffine pour le système nerveux central. Or, si pour étudier les corpuscules de Negri dans la rage de la rue la paraffine est suffisante, il est *indispensable*, pour obtenir des préparations convenables de nos corps, de recourir à la celloïdine. Une fois les pièces bien imprégnées, il faudra éviter de durcir tant soit peu la celloïdine en masse. Il suffira d'entourer la pièce d'une légère couche de celloïdine assez épaisse et de laisser sécher à l'air, pendant quelques minutes. Au bout de

(1) *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, p. 374, 10 novembre 1906.

ce temps il faut mettre le morceau inclus dans un mélange formé de :

Alcool absolu.	50 cent. cubes.
Chloroforme.	5 —

Ce liquide durcit suffisamment la pièce et remplace l'alcool absolu dans l'inclusion à la paraffine qui doit suivre l'inclusion de la celloïdine. Il faudra éviter le xylol et se servir de toluène ou d'essence de cèdre.

Grâce à cette inclusion, on obtient de fort belles préparations de tissu nerveux, d'une grande délicatesse. Les prolongements cylindre-axiles sont conservés aussi.

Mais, nous le répétons, il faut se garder de durcir la masse de celloïdine ! On suivra la technique que nous venons d'indiquer. C'est à ce prix qu'on évitera les plis des coupes, plis qui résisteraient aux tentatives de déplissement et compromettraient gravement le collage ainsi que les colorations. Tandis qu'en procédant comme nous l'avons fait, il sera très facile d'obtenir des coupes excellentes et très fines : 1 μ.

Description des corpuscules de Negri.

Les corpuscules de Negri (planche XXIV, figures 2, 3, 4, 6) se trouvent, le plus souvent, dans le cytoplasme et dans les gros prolongements dendritiques des cellules nerveuses. Leur dimension est variable, généralement de 1 à 27 μ, mais on peut rencontrer des corpuscules dépassant ces dimensions. Les corps les plus communs mesurent 3, 4, 8, 10 μ ; il y en a de si petits qu'ils sont à peine mesurables. Leur forme est aussi variable ; ordinairement elle est en rapport avec leur situation dans la cellule nerveuse ; généralement arrondie, elle est ovalaire quand elle est comprimée par le noyau ; cette compression peut donner aux corpuscules de Negri des formes diverses. Dans les prolongements protoplasmiques ils sont plus ou moins fusiformes.

Les corps de Negri possèdent une structure : en les observant avec un grossissement convenable, on voit, dans une masse homogène, des corpuscules arrondis plus clairs. Souvent ces corpuscules contiennent à leur tour un ou plusieurs corpuscules.

Quelquefois, à la place de ces derniers corpuscules, il existe des bâtonnets courts. Parfois, au lieu de se colorer en rouge, ces inclusions sont teintes par la méthode de Mann en bleu clair et leur contenu en bleu foncé. Il arrive aussi que les inclusions restent colorées en rouge et les tout petits corpuscules, ainsi que les bâtonnets, se détachent en bleu foncé. Il y a des corps de Negri contenant des inclusions de même dimension. Dans d'autres corps, il existe un corpuscule central notablement plus volumineux que les autres corpuscules qui l'entourent à la manière d'une couronne. Il y en a qui contiennent un plus grand nombre d'inclusions volumineuses. Le nombre de ces inclusions est variable; dans les corpuscules de Negri de grande taille, on peut en compter 20, 30 et même plus; dans les petits, 6, 5, 3, 2, 1.

Les corpuscules de Negri sont entourés par une membrane hyaline visible, même dans les coupes.

Comme nous l'avons dit, la thionine phéniquée, le bleu polychrome de Unna, le bleu de toluidine à 1 p. 100, donnent d'excellentes colorations des corpuscules, surtout dans les coupes. Leur masse homogène se colore d'un beau bleu azur, les inclusions sont d'une teinte pâle et les minuscules corpuscules et les bâtonnets d'un bleu très foncé.

Signalons encore l'hématoxyline au fer qui les colore fortement en masse. De sorte que, pour obtenir une différenciation convenable, il faut décolorer énergiquement les coupes; les corpuscules résistent encore, alors que dans la cellule nerveuse tout (même quelquefois le nucléole) est décoloré. Différenciés suffisamment, les corpuscules laissent voir leur structure.

Le liquide de Flemming, grâce à son acide osmique, donne aux corpuscules de Negri une coloration brunâtre.

A côté des corpuscules, qui se colorent en rouge par la méthode de Mann, il y en a qui se colorent en violet, d'autres qui sont « dégénérés ». Dans certains cas on peut suivre toutes les étapes de cette dégénérescence. Nous reviendrons ultérieurement sur cette question.

Importance des corps de Negri dans le diagnostic de la rage des rues.

Nous avons dit que la découverte de Negri était très importante pour le diagnostic de la rage des rues. En effet, dans la rage déclarée, les corps de Negri existent presque constamment, comme le montre le tableau suivant, établi grâce au concours précieux de M. J. Viala, préparateur au service antirabique :

NOMBRE de sujets observés.	PRÉSENCE des corps de Negri et épreuve expérimentale positive.	ABSENCE des corps de Negri et épreuve expérimentale négative.	ABSENCE des corps de Negri et épreuve expérimentale positive.	PRÉSENCE des corps de Negri et épreuve expérimentale négative.
201	106	82	4	9

Nous dirons aussi que les corpuscules de Negri sont les éléments caractéristiques de la rage des rues. En effet, nous avons étudié un grand nombre de pièces provenant de maladie des jeunes chiens, de paralysie générale, de maladie du sommeil, d'individus très âgés, et jamais nous n'avons constaté la moindre trace de corpuscules dans le système nerveux.

D'où vient alors que, dans notre tableau, dans 9 cas, malgré la présence des corps de Negri, l'épreuve expérimentale ait été négative? Est-ce parce que le virus était détruit, ou, étant rare dans le bulbe des animaux, était-il inoculé en quantité insuffisante? Est-ce encore parce que les cobayes inoculés étaient réfractaires, ou la maladie a-t-elle demandé une incubation trop longue (1)?

D'autre part, nous savons qu'il y a des cas où l'inoculation intra-cérébrale donne des résultats positifs alors que l'inoculation intra-musculaire reste négative. Et comme, pour des raisons d'ordre spécial (2), au service de la rage, on emploie généralement la voie intra-musculaire (muscles du cou), il est probable que dans ces 9 cas on ait eu affaire à la rage.

(1) A l'Institut Pasteur, on garde en observation les animaux inoculés pendant six mois; au bout de ce temps on s'en débarrasse.

(2) L'état de conservation des animaux envoyés à l'Institut Pasteur laissant souvent beaucoup à désirer, M. J. Viala est obligé de recourir à l'inoculation intra-musculaire. En effet, malgré le séjour dans la glycérine, l'inoculation intra-cérébrale provoquerait une infection rapidement mortelle.

Voici deux exemples démonstratifs.

Il s'agit de deux cas de rage humaine (dans les cas de rage humaine, on a l'habitude de pratiquer en même temps l'inoculation intramusculaire chez le cobaye et de risquer l'inoculation intracérébrale).

Premier cas. — On a fait à un lapin l'inoculation intracérébrale d'émulsion de bulbe, on a inoculé en même temps deux cobayes dans les muscles du cou ; 17 jours après, le lapin était paralysé et il mourait au bout de 2 jours On a inoculé de nouveau le même virus dans le cerveau d'un deuxième lapin : 21 jours après, il était paralysé, et il succombait 2 jours après. Les deux cobayes inoculés ne présentaient rien d'anormal au bout de six mois.

Deuxième cas. — On a fait une inoculation intracérébrale à un lapin, en même temps on inoculait deux cobayes dans les muscles du cou : 11 jours après, le lapin présentait des symptômes de rage et il succombait 4 jours après. Quant aux deux cobayes, ils étaient encore indemnes au bout de six mois.

Dans ces deux cas de rage humaine, la corne d'Ammon, l'écorce cérébrale, le cervelet, la protubérance, le bulbe, la moelle épinière, les ganglions cérébro-spinaux, le ganglion cervical supérieur, renfermaient des corps de Negri, mais les corpuscules étaient surtout abondants dans la corne d'Ammon. De même les cornes d'Ammon des trois lapins qui avaient succombé à la rage expérimentale, contenaient de nombreux corpuscules de Negri.

Comme on le voit, si l'on s'était contenté d'inoculations intramusculaires chez les cobayes, l'épreuve expérimentale aurait été négative.

De l'existence de formations spéciales dans la rage a virus fixe.

Negri n'avait pas trouvé ses corpuscules dans la rage à virus fixe. Plus tard Negri et de rares auteurs ont décrit des corpuscules plus petits et plus rares que ceux de la rage des rues. D'autres auteurs nient l'existence des corps dans la rage à virus fixe.

Parallèlement à nos recherches sur la rage des rues, nous

avons étudié les centres nerveux de lapins atteints de rage à virus fixe. Toujours grâce à l'obligeance de M. J. Viala, nous avons pu étudier 120 cas de rage à virus fixe chez le lapin. Dans 102 cas, les animaux étaient sacrifiés à la dernière période de leur maladie, dans 6 cas au début, et 12 cas dans le cours de la maladie. Nous avons prélevé chez tous ces animaux la corne d'Ammon, l'écorce cérébrale, le cervelet, la protubérance, le bulbe, la moelle épinière, les ganglions cérébro-spinaux et sympathiques. En utilisant surtout la méthode de Mann, nous avons observé constamment, chez les animaux arrivés à la dernière période de la maladie, et dans les centres nerveux précités, des corpuscules colorés en rouge dont les plus volumineux, d'ailleurs en petit nombre, rappellent les petites formes décrites par Negri dans la rage des rues. Plus particulièrement, le tissu nerveux de l'écorce cérébrale et de la corne d'Ammon est pour ainsi dire constellé de très fines granulations (planche XXIV, fig. 5). Dans ces régions du cerveau, les cellules nerveuses renferment un grand nombre de corpuscules qui sont surtout abondants dans les grains du corps godronné et dans les petites cellules pyramidales de la corne d'Ammon. Les expansions des cellules nerveuses, les grosses dendrites plus que les autres, ainsi que le tissu interstitiel, contiennent aussi des corpuscules en quantité inouïe. Mais ce sont le cytoplasme et les troncs protoplasmiques des cellules nerveuses qui en contiennent le plus ; en effet, la forme du corps cellulaire et des grosses expansions dendritiques se révèle grâce à de véritables traînées de corpuscules.

Ces corpuscules sont généralement fort petits ; en les observant avec de puissants objectifs on en constate de si minuscules qu'ils sont à peine visibles, et on a l'impression qu'il doit y en avoir d'autres qui échappent à l'œil.

Ces formations, qu'on rencontre en bien plus petite quantité au début, mais déjà en grand nombre dans le cours de la maladie, manquent chez les animaux témoins (1).

(1) On doit éviter une confusion : il existe, en effet, dans le cytoplasme des cellules nerveuses des ganglions cérébro-spinaux et sympathiques normaux, des corpuscules qui ressemblent à ceux que nous venons de décrire. Généralement peu nombreux, mais quelquefois en grand nombre, surtout chez le lapin. — Ces corpuscules se colorent électivement en rouge par la méthode de Mann.

L'hémotoxyline au fer colore aussi ces corpuscules, mais d'une façon très inégale. En plus, comme tout est coloré en noir dans les coupes, la bonne différenciation qui existe dans la méthode de Mann manque ici.

A côté des corpuscules qui se colorent en rouge vif par la méthode de Mann, il y en d'autres qui sont bleus, bleuâtres; il y en a qui sont d'un bleu très pâle.

Sur les 102 cas, — animaux arrivés à la dernière période de paralysie, — huit fois nous avons observé une particularité curieuse.

Alors que chez ces animaux le cervelet, la protubérance, le bulbe, la moelle, les ganglions cérébro-spinaux et sympathiques, renfermaient de petits corps, l'écorce cérébrale et la corne d'Ammon renfermaient, à part ces petits corps, d'autres corpuscules absolument semblables à ceux qu'on rencontre dans la rage des rues. Nous en avons observé un grand nombre dont les dimensions dépassaient celles des corpuscules de la rage des rues (planche XXIV, fig. 6). Un certain nombre d'entre eux avaient presque la dimension d'une grande cellule pyramidale de la corne d'Ammon!

ÉTUDE COMPARATIVE DES CORPUSCULES DE NEGRI ET DE NOS FORMATIONS AVEC LES CORPUSCULES DES CORPS RÉSIDUELS DU TESTICULE.

Les corpuscules de Negri sont-ils des parasites? Negri et nombre d'auteurs l'affirment. Quant à nous, nous croyons que, dans l'état actuel de la science, une pareille affirmation serait téméraire.

D'autre part, il nous a semblé intéressant d'étudier certaines dégénérescences physiologiques et de chercher si, dans une cellule ou une portion de cellule qui dégénère, il n'y aurait pas de formations rappelant, par leur forme et leurs caractères histo-chimiques, les corpuscules de Negri et nos formations de la rage à virus fixe.

Nous nous sommes adressé à cet effet à l'étude de la spermatogénèse chez quelques mammifères : rat, cobaye et lapin. Les pièces ont été fixées par le sublimé de von Lenhossek, le liquide de Zenker et par le formol picrique de Bouin.

Voici le résultat de nos recherches (1).

On sait que dans la transformation des spermies, de la forme spermatide à la forme spermatozoïde, la partie du cytoplasme, qui ne prend pas part à cette transformation, est destinée à disparaître. On y constate alors des corpuscules très fins, qui deviennent de plus en plus volumineux et se colorent mieux. Bientôt ces lobes cytoplasmiques en train de dégénérer perdent la netteté de leur contour et finissent par se détacher des spermatozoïdes (planche XXV, fig. 1). On les désigne alors sous le nom de *corps résiduels*. Dans les corps résiduels, les corpuscules précités se groupent en sphères volumineuses et peu nombreuses ; ils contiennent alors, parmi une masse homogène, une ou plusieurs sphérules, qui à leur tour renferment de tout petits corpuscules. D'autres corps renferment, parmi leur masse simplement, de fins corpuscules (planche XXV, fig. 2 et 3).

Comme le corps de Negri, ces corps sont entourés par une masse incolore, et la méthode de Mann les colore en rouge, quelquefois aussi en bleu ; dans la méthode à l'hématoxyline ferrique, ils se laissent décolorer très difficilement et ils présentent une coloration brunâtre après la fixation au liquide de Flemming.

Le processus dégénératif se poursuivant toujours, chaque corps présente des dépressions à sa surface et des vacuoles dans son intérieur, et comme à ce moment le syncytium sertolien commence à se rétracter, les corps résiduels qui se trouvent incorporés dans ce syncytium sont entraînés vers la couche génératrice du tube séminifère. Ainsi phagocytés, quelques-uns se colorent en rouge par la méthode de Mann, mais un grand nombre se colorent en rouge violacé ou en bleu de plus en plus pâle. A ce moment, l'acide osmique les noircit plus complètement.

Enfin, ces corps cessent d'être colorables par la méthode de Mann. On peut les colorer en noir par l'acide osmique en même temps que d'autres substances élaborées par le syncytium. La phagocytose de ces éléments est terminée.

Or, les petites formes du début, qui apparaissent dans le

(1) Y. Manouélian, *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, 24 février 1908, page 419.

lobe cytoplasmique des spermatides (1), *rappellent*, par leur forme et les réactions histo-chimiques, les corpuscules fins qu'on observe dans la rage des rues, et surtout ceux que nous avons décrits dans la rage à virus fixe. Quant aux corps plus volumineux, ils rappellent ceux de Negri dans la rage des rues.

On pourrait aussi établir un certain rapprochement au point de vue de la dégénérescence et de leur disparition. En effet, dans quelques cas de rage des rues, notamment chez l'homme, à côté des corps de Negri typiques, nous avons constaté des corpuscules qui, tout en possédant la même structure que ceux-ci, ne se colorent pas aussi électivement. Ils ont une teinte rougeâtre, violacée ou bleuâtre; peu à peu les vacuoles se montrent dans leur intérieur et ces corpuscules deviennent de plus en plus pâles; il en existe qui se trouvent à la limite de la colorabilité (planche XXV, fig. 4). Comme nous l'avons dit précédemment : dans la rage à virus fixe, à côté des corpuscules qui se colorent en rouge, il y en a d'autres qui sont bleuâtres; enfin il y en a qui sont d'un bleu très pâle.

Nous estimons que les faits que nous venons de relater, doivent faire réfléchir les chercheurs, qui ne se prononceront pas hâtivement sur la nature parasitaire des corpuscules de Negri.

Conclusions.

1° *Les corps de Negri étant les éléments caractéristiques et presque constants de la rage des rues, leur recherche est de première importance pour le diagnostic de cette maladie.*

2° *Dans la rage à virus fixe, il existe constamment des formations spéciales; traînées de fins corpuscules en nombre incalculable, remplissant surtout le corps et les gros troncs protoplasmiques des cellules nerveuses.*

3° *Au point de vue de leur forme, de leur structure, de leur caractère histo-chimique et du mode de régression, il existe une*

(1) Signalons la ressemblance de ces formes avec les corps chromatoïdes des spermatocytes et des spermies.

certaine analogie entre les corpuscules de Negri et nos formations d'une part, et les corpuscules des corps résiduels du testicule d'autre part.

EXPLICATION DES PLANCHES

Toutes les figures représentent des préparations faites par la méthode de Mann et dessinées à la chambre claire. *Pour toutes les autres indications, consulter le texte de notre travail.*

PLANCHE XXIV.

Le grossissement des préparations est de 780 diamètres.

FIG. 1. — Coupe de corne d'Ammon de lapin normal. On voit nettement les neurofibrilles dans la tige protoplasmique et dans le cytoplasme des cellules pyramidales.

FIG. 2. — Coupe de la corne d'Ammon de chien rabique (rage des rues).

FIG. 3. — Coupe de la corne d'Ammon d'un autre chien rabique (rage des rues).

FIG. 4. — Frottis de corne d'Ammon de chien rabique (rage des rues).

FIG. 5. — Coupe de corne d'Ammon de chien atteint de rage à virus fixe; dernière période de la maladie. Cas habituel.

FIG. 6. — Coupe de corne d'Ammon de chien atteint de rage à virus fixe; dernière période de la maladie. Cas exceptionnel.

PLANCHE XXV.

Le grossissement des préparations 1, 2, 3 est de 600 diamètres.

FIG. 1. — Coupe de tube séminifère de rat normal. Les spermatozoïdes sont groupés en faisceaux. Quelques-uns de ces faisceaux se trouvent tout près des noyaux de Sertoli (S); d'autres ont déjà gagné les couches plus profondes du tube. Remarquer les fins corpuscules colorés en rouge qui existent en nombre incalculable dans la partie interne du tube.

FIG. 2 et 3. — Coupes de tubes séminifères de rat normal. Les spermatozoïdes sont dans la lumière des tubes. Il existe de nombreux corps résiduels *r* dans le voisinage des spermatozoïdes; il s'en trouve aussi dans les différentes couches. On peut suivre les phases de leur transformation.

FIG. 4. — Cellules nerveuses de la corne d'Ammon d'un sujet mort de rage. On y voit la dégénérescence et presque la disparation des corps de Negri. Grossissement = 780 diamètres.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DU POTASSIUM ET DU SODIUM CHEZ LES ANIMAUX

par P.-J. GÉRARD
Pharmacien de 1re classe.
(Travail du laboratoire de M. G. Bertrand).

Le potassium et le sodium n'ont pas été étudiés jusqu'ici chez les animaux d'une façon systématique et rationnelle. La littérature chimique nous livre une quantité considérable de faits isolés qu'il est impossible de grouper, parce que les dosages des éléments minéraux n'ont pas été effectués sur les organes de mêmes individus, ou tout au moins sur des individus se trouvant dans les mêmes conditions physiologiques.

Le potassium et le sodium sont cependant parmi les constituants les plus importants de la matière vivante et il est intéressant d'étudier leur distribution dans l'organisme et, si possible, leur métabolisme. Sur les conseils de M. le professeur Gabriel Bertrand, dans le laboratoire duquel un travail d'ensemble sur les éléments minéraux a été entrepris, je me suis mis à étudier cette question.

Il fallait avant tout posséder une méthode d'analyse irréprochable, et c'est ce à quoi je me suis tout d'abord attaché. Car si, comme je le disais à l'instant, la différence des conditions physiologiques dans lesquelles peut se trouver un organisme en fait varier la teneur minérale, il est, par contre, une autre raison, toute différente d'ailleurs, qui contribue à faire varier les résultats : ce sont les méthodes d'analyses employées. Le dosage des alcalis se classe parmi les plus difficiles, et les différents auteurs qui se sont occupés de la question du Ka et du Na semblent souvent se désintéresser par trop de la partie analytique pure de la question. Dans leur communication, ils omettent de mentionner leur procédé d'analyse, ou le font de façon tellement succincte qu'une critique précise est impossible. Les résultats qu'ils livrent à la littérature perdent de ce fait une grande partie de leur valeur.

Méthode de dosage.

Nous ne passerons pas en revue toutes les méthodes de dosage du potassium et du sodium ; qu'il nous suffise de dire que, rejetant par principe les méthodes volumétriques, nous leur avons préféré les méthodes gravimétriques, plus longues il est vrai, mais aussi beaucoup plus précises.

Les procédés à l'acide perchlorique de Schlœsing, à l'hyposulfite de bismuth de Carnot, au bichlorure de platine de Corenwinder et Contamine, sont, tous trois, de bons procédés d'insolubilisation du potassium, permettant la séparation complète de ce dernier et l'isolement du sodium que l'on peut peser. Nous avons donc tous les moyens de contrôle exigibles pour faire un bon dosage. Nous avons choisi la méthode de Corenwinder et Contamine, étant donnée la facilité de préparation, à l'état de pureté, du réactif chloroplatinique, l'insolubilité pour ainsi dire totale du chloroplatinate de K dans le liquide de lavage alcool-éther à 10 p. 1 et les bons résultats que différents essais théoriques nous ont donnés.

A. *Calcination.* — Après avoir pesé l'organe à l'état frais, puis l'avoir desséché à 100 degrés, on procède à la calcination dans un four à moufle, en ne dépassant jamais la température de 350 à 400 degrés qui correspond à peine au rouge sombre. Dans ces conditions, aucune perte de chlorures n'est à craindre. Les cendres, pulvérisées finement, sont épuisées par environ mille fois leur poids d'eau chaude. De cette façon, tout le potassium et le sodium sont entraînés, et nous avons dissous fort peu de calcium et de magnésium, ce qui permet de faire le dosage dans de très bonnes conditions.

B. *Elimination du calcium, du magnésium et de l'acide phosphorique.* — Pour éliminer en bloc les sels alcalins terreux, on ajoute à la liqueur du phosphate d'ammoniaque et de l'ammoniaque (ce dernier réactif doit représenter environ 1/5 de la liqueur totale). On filtre au bout d'une douzaine d'heures, puis la solution étant ramenée à l'exacte neutralité par addition d'HCl, on procède à l'élimination de l'acide phosphorique par le procédé ordinaire (perchlorure de fer et acétate d'ammoniaque).

Après le lavage méthodique du précipité ferrique, facilité d'ailleurs par la centrifugation et l'addition de petites quantités de chlorhydrate d'ammoniaque, addition qui aide à la condensation du précipité, on évapore à sec toutes les liqueurs de lavages réunies.

C. *Élimination des sels ammoniacaux. Pesée à l'état de sulfates.* — Sur le résidu sec composé de sels d'ammonium, de potassium et de sodium, on verse d'abord de l'acide sulfurique dilué au tiers afin d'éviter les projections, puis de l'acide pur jusqu'à complète dissolution de tous les sels. On chauffe ensuite à feu nu sur une petite flamme de Bunsen en évitant l'ébullition; quand toute l'eau est disparue, on peut alors chauffer plus énergiquement pour expulser les dernières traces d'acide sulfurique. Lorsque l'on est arrivé à sec, on fond alors les sulfates acides de K et de Na pour les transformer en sulfates neutres. Si l'on opère sur de petites quantités, au maximum 0 gr. 300 de sulfates, il est inutile d'ajouter du carbonate d'ammoniaque pour obtenir des sulfates neutres. Une fusion de cinq minutes suffit largement et l'on peut ensuite procéder à la pesée.

D. *Transformation des sulfates en chlorures. Pesée des chlorures.* — Les sulfates sont transformés en chlorures par l'addition d'acétate neutre de plomb. On ajoute à la liqueur 1/5 environ d'alcool, afin d'insolubiliser complètement le sulfate de plomb. On filtre et on enlève l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré, en opérant en milieu très légèrement chlorhydrique. On condense le précipité au bain-marie et on filtre. L'évaporation à sec en présence d'HCl donne toujours des chlorures un peu sales. Ceci tient à ce qu'il passe toujours un peu de sulfure de plomb en solution. Il suffira de porter ces chlorures à 350 et 400 degrés pendant quelques minutes pour insolubiliser complètement le sulfure de plomb, reprendre par un peu d'eau et filtrer; on obtient ainsi des chlorures très blancs que l'on pèse après une dessiccation de quelques heures à 350 et 400 degrés. Il faut environ six heures pour arriver à un poids constant.

E. *Précipitation du K. Précipitation du Pt du chloroplatinate et pesée du platine.* — On verse sur les chlorures desséchés un excès de réactif chloroplatinique et l'on concentre au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse. Il faut surtout éviter la surchauffe des parois de la capsule et la dessiccation complète

du réactif. On ajoute alors au sirop un mélange alcool-éther à 10 p. 1 (environ 20 volumes) et, après une demi-heure, on filtre. Le chloroplatinate de K formé reste sur le filtre, tout le sodium passe à l'état de chloroplatinate de sodium dissous dans un excès de réactif chloroplatinique. On redissout le chloroplatinate de K dans l'eau bouillante et l'on précipite le platine par le procédé au magnésium Villiers-Berg, qui donne des résultats théoriques. Il faut ajouter le magnésium par toutes petites portions dans le liquide rendu chlorhydrique afin d'éviter les projections. Le précipité de platine est lavé jusqu'à ce qu'il soit débarrassé entièrement du chlorure de magnésium. Le platine est ensuite pesé. Le poids trouvé multiplié par 0,40195 donne le poids de potassium correspondant.

F. *Précipitation du Pt du chloroplatinate de sodium. Pesée du sodium.* — Le liquide éthéro-alcoolique contenant tout le sodium est ensuite traité par un réducteur afin de précipiter le platine du chloroplatinate de sodium. Seule, l'action combinée de l'acide formique et de l'acide sulfureux a donné de bons résultats. L'essai de tous les autres réducteurs volatils est incommode et réduit mal le chloroplatinate. On peut encore, ce qui est aussi pratique, précipiter par H^2S à chaud en milieu légèrement acide. On sépare le sulfure de platine par filtration et le liquide filtré est évaporé en présence d'acide sulfurique. On pèse le sodium à l'état de sulfate.

Ce procédé, long à expliquer et à exécuter, donne de très bons résultats et accumule les moyens de contrôle. On peut, en effet, calculer le sodium d'après le poids de potassium et de sulfates neutres totaux. La pesée du sodium isolé à l'état de sulfate viendra confirmer le calcul. Au besoin, la simple pesée des chlorures pourrait servir de contrôle, car, connaissant par le calcul, les quantités exactes de sulfate de sodium et de potassium, on peut en déduire les quantités exactes de chlorures que l'on doit obtenir.

De nombreux dosages théoriques faits en présence de calcium, de magnésium et de fer ne nous ont jamais donné d'erreurs supérieures à 2 p. 100. Le chiffre de sodium trouvé à la pesée est toujours légèrement inférieur au chiffre trouvé par le calcul, étant données les pertes qu'il est impossible d'éviter lorsque l'on filtre et lave un précipité. Le chiffre de sodium calculé est

donc le chiffre qu'il faut prendre, le chiffre de sodium pesé ne devant servir que de contrôle.

Le plus grand reproche que l'on puisse faire, en général, aux auteurs qui ont eu à doser le potassium et le sodium, est d'avoir employé le chlorure de baryum pour précipiter l'acide sulfurique et l'acide phosphorique. Le sulfate de baryte entraîne toujours, malgré les lavages, une assez grande quantité d'alcalis. Néanmoins, comme en matière biologique, tout au moins pour ce qui concerne les alcalis, une rigueur absolue n'est pas nécessaire, et que c'est seulement d'une suite de dosages pouvant se comparer que découlent des conclusions intéressantes, notre critique de tendance analytique ne porte pas sur l'ensemble des travaux des célèbres physiologues tels que Bunge, par exemple, travaux d'ailleurs que beaucoup de nos recherches n'ont fait que confirmer.

Répartition du potassium et du sodium dans l'organisme d'un chien.

En possession d'une bonne méthode de dosage, nous avons pu aborder le vif du sujet. Le premier problème que nous avons essayé de résoudre était de définir, d'une façon aussi précise que possible, la répartition du potassium et du sodium dans l'organisme d'un chien adulte. Bien des auteurs jusqu'ici, tels que Bischof, Volkmann, Hugounencq, etc., s'étaient livrés à l'étude des éléments minéraux de la matière vivante. Le nombre des analyses que l'on trouve dans la littérature est énorme, mais dans beaucoup le dosage des alcalins est omis. Jamais un travail méthodique n'a été entrepris dans le but d'obtenir des analyses d'organes que l'on puisse comparer entre elles. Pour ce faire, il fallait enlever à un chien, par exemple, tous les organes et les analyser séparément. La plasticité minérale de la matière vivante est très grande, comme nous le verrons plus tard, et il est impossible de comparer les teneurs minérales d'organes ayant appartenu à des chiens différents non soumis au même régime alimentaire.

Nous avons pris comme sujet d'expérience un chien mâle de 6 kilog. 060 que l'on tua par une saignée à blanc pratiquée à la carotide, afin de priver autant que possible de sang tous les

organes. Nous ne donnerons pas ici le résultat de toutes les analyses, il suffira, pour se renseigner à ce sujet, de se rapporter au travail complet (1). Nous nous contenterons de relater les faits principaux et les quelques idées générales qui peuvent découler de ce travail :

Il importe avant tout, si l'on veut obtenir un classement raisonnable des organes par leur teneur en alcalins, d'envisager non pas la richesse en potassium et en sodium de tel organe par rapport à son poids frais ou au poids de ses cendres totales, mais bien la grandeur du rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$. La richesse en potassium d'un organe ne vaut que comparée à sa richesse en sodium, de ce rapport seulement on peut tirer quelques enseignements utiles. Un exemple fera comprendre la valeur de notre argumentation : si nous classons les organes d'après leur richesse en sodium par rapport au poids de cendres totales, nous voyons voisiner dans la liste deux organes tout à fait dissemblables, le tissu osseux et l'intestin grêle qui est un tissu nettement glandulaire. Ceci n'a apparemment aucune raison d'être. En effet, le tissu osseux a ses cendres totales composées en majeure partie de cendres insolubles auxquelles nous rapportons la teneur en sodium ; le tissu glandulaire, au contraire, a la presque majorité de ses cendres totales solubles. Donc, le tissu osseux est pauvre en sodium par rapport à ses cendres insolubles et non par rapport à son potassium, tandis que le tissu glandulaire est pauvre en sodium par rapport à ses cendres solubles, c'est-à-dire par rapport à son potassium. Il en est de même lorsque nous groupons les organes suivant leur richesse en potassium. Seul, le classement par ordre de grandeur du rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ semble intéressant, il suit d'ailleurs de très près la classification histologique des tissus.

1° Dans les tissus musculaires (cœur, langue, muscles, diaphragme), les tissus glandulaires (pancréas, intestin grêle) et les glandes (foie, rate) ont un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ très élevé, il atteint 2,5 et 2,7 et, bien que s'abaissant fortement dans les

(1) *Thèse Doct. ès. sc. nat.*, Paris, 1912.

glandes à sécrétion interne, telles que le corps thyroïde et les capsules surrénales, il ne tombe jamais au-dessous de l'unité;

2° Le tissu nerveux possède aussi un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ assez élevé. Il varie entre 1,96 (hémisphères cérébraux) et 1,00 (nerfs, sciatique et pneumo-gastrique). Le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ s'abaisse au fur et à mesure de la disparition de la substance grise. La moelle, qui renferme proportionnellement moins de substance grise que les hémisphères cérébraux et le bulbe, a un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ moins élevé; les nerfs, finalement, qui sont constitués presque uniquement de substance blanche (fibres à myéline) ont le rapport le plus faible, il égale 1,00;

3° Les tissus à fonction de conduction (artères, veines, urètre), de soutien (cartilage, os) ou de protection (peau, poils, ongles) ont un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ très faible qui n'atteint jamais l'unité.

En un mot, on peut dire que les tissus riches en cellules, à fonction élevée, sont riches en potassium et pauvres en sodium, tandis que les autres tissus voient leur teneur en potassium décroître au profit de leur teneur en sodium. Il est donc erroné de définir, comme on le fait souvent dans les livres, le potassium comme un élément cellulaire et le sodium comme un élément circulant. Le sodium, lui aussi, peut-être un élément cellulaire, et plus important que le potassium, lorsqu'il s'agit de tissus de soutien comme le tissu osseux, cartilagineux ou de tissu élastique. Cette notion, que l'on avait fini par étendre à tous les tissus, venait de ce que l'on appliquait à ceux-ci ce que l'on sait sur le tissu sanguin, où le Na est entièrement confiné dans l'élément circulant (le plasma) et le K fixé presque uniquement sur les cellules (les globules du sang).

Pour fixer les idées, sans surcharger notre mémoire, nous donnons le détail de quelques-unes de nos analyses faites sur les tissus les plus importants. On trouvera, en effet, dans le tableau suivant, les quantités de potassium et de sodium trouvées, rapportées à 100 de parties fraîches et à 100 de cendres totales.

	POIDS frais.	POUR CENT de poids frais.		POUR CENT de cendres totales.		RAPPORT $\frac{Na}{K}$.
		K.	Na.	K.	Na.	
Muscle (échantillon moyen . . .	2.752 00	0,318	0,120	24,53	9,24	2,65
Cœur	57 01	0,275	0,100	22,89	8,35	2,74
Hémisphères	58 00	0,304	0.155	20.60	10,50	1,96
Moelle	16 09	0,182	0,170	12,40	10,10	1,11
Ganglions mésentériques. . . .	3 50	0,322	0,191	20,00	11.85	1,50
Foie	206 00	0,287	0,086	19,87	6,00	3,31
Pancréas	19 10	0.273	0.073	.6.66	4.30	3,70
Squelette	762 00	0,106	0,13	0.309	0.403	0,76
Artère (aorte).	8 00	0,160	0,211	15,50	20,08	0,74
Reins.	35 00	0,257	0,192	20,34	15.10	1,34
Testicule	9 10	0,281	0,160	21,80	13.10	1,60
Ganglions lymphatiques	4 00	0,410	0,345	19,83	16,58	1,19
Intestin grêle.	205 00	0,160	0,054	13,55	4,57	2,96
Gros intestin	32 30	0,160	0,165	14,80	15,30	0,95
Sang	388 00	0,020	0.248	2.25	27,60	0,08
Peau	553 00	0,135	0,222	13,84	22,84	0,61

Étude des variations minérales de l'organisme au point de vue de sa teneur en potassium et en sodium.

La teneur minérale d'un organe n'est pas constante, ce fait a été démontré depuis longtemps. De nombreux auteurs ont vu qu'un même organe sain, puis malade, ne renfermait pas le même taux d'éléments minéraux. Le sang, en particulier, a été très étudié et, dans les cas d'anémie, il a présenté des variations considérables. Il nous a paru intéressant d'étudier d'abord l'influence de la saignée sur la composition sanguine du lapin. Nous étudierons ensuite l'influence d'une alimentation nettement sodique sur la teneur en potassium et en sodium de l'organisme et, à ce propos, nous aurons l'occasion de revenir sur le problème intéressant de la faim de NaCl produite par les alimentations fortement potassiques, c'est-à-dire végétariennes. Cette question, que Bunge semblait avoir résolue d'une façon définitive, a été ensuite fortement controversée; les quelques expériences que nous avons faites à ce sujet semblent, au contraire, confirmer les théories du savant physiologue.

1° *Influence de la saignée sur la teneur en potassium et en sodium du sang du lapin.* — On a beaucoup étudié les transformations du sang après la saignée; mais on ne s'est guère intéressé qu'aux transformations de la composition anatomique ou organique de ce tissu. De l'ensemble de ces observations, il résulte que le sang réagit fortement pour se conserver identique à lui-même, et de même qu'il reconstitue rapidement ses globules et ses albumines, il rattrape aussi rapidement son taux salin. Le sang se reconstitue évidemment aux dépens des tissus. Or, il est d'opinion courante que le potassium est un élément plus fixe que le sodium et n'abandonne les tissus qu'au fur et à mesure de leur destruction. Si donc nous saignons un lapin et lui soutirons une certaine quantité de matières minérales, il est permis de supposer que le sang ne revient pas aussi vite à son taux primitif de potassium qu'à son taux de sodium, et que pendant un certain temps ce dernier supplée le potassium pour maintenir l'isotonie.

Le résultat a confirmé nos suppositions : on enlève à un lapin de 2 kilogrammes, 20 grammes de sang par une ponction au cœur, suivant la technique indiquée par Nicolle et Ducloux; douze heures après, on lui enlève encore 15 grammes de sang. On attend deux jours, on lui enlève cette fois 40 grammes de sang et, douze heures après, 20 grammes. On analyse la première, la deuxième et la quatrième ponctions. Le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ va toujours en diminuant. Il est successivement égal à 0,68, 0,63, 0,61. Le potassium ne revient pas de suite à son taux normal, tandis que le sodium est de suite remplacé par le sodium des tissus. Pendant l'expérience, nous avons seulement donné à boire au lapin, afin qu'il ne rattrape son taux minéral sanguin qu'aux dépens de ses tissus.

2° *Influence de l'alimentation sur la teneur en potassium et en sodium de l'organisme des chiens et des souris.* — Avant de relater le résultat de nos expériences, nous allons donner un rapide aperçu de la question de « la faim de sel » qui se rattache directement à ce chapitre. En effet, en donnant à un chien une alimentation fortement potassique, nous nous plaçons exactement dans le cas de l'animal ne se nourrissant que

de végétaux très riches en potassium et pauvres en sodium. Bunge avait prétendu que les herbivores seuls ayant besoin d'un supplément de chlorure de sodium à leur alimentation, ceux-ci devaient leur appétence spéciale pour le sel à ce que leur alimentation était très riche en potassium. Après s'être livré à des expériences *in vitro*, où il montre que du carbonate de potassium ou du phosphate de potassium en solution aqueuse, mêlés à du chlorure de sodium, échangent partiellement leur acide en donnant du carbonate de sodium ou du phosphate de sodium et du chlorure de potassium, il en déduit qu'*in vivo* une réaction identique a lieu. Le carbonate de potassium des végétaux donnera du carbonate de sodium et du chlorure de potassium avec le chlorure de sodium du sang. Ces sels ne faisant pas partie de la composition minérale normale du sang, seront rejetés par l'urine et à l'absorption de sels de potassium sera consécutive une élimination de sodium.

Bunge procède alors à une expérience sur lui-même; il ingère 18 grammes de K^2O à l'état de phosphate et il constate une élimination de 8 grammes de sodium par son urine. Cette quantité de sodium éliminée représente la moitié du sodium contenu dans les 5 litres de sang. On ne peut donc douter de la participation des tissus à cette perte. Si nous donnons donc, pendant un temps assez long, une alimentation très riche en potassium et pauvre en sodium, il est probable que nous appauvrirons l'organisme de l'animal en sodium. Seule l'analyse des organes après un assez long régime et le bilan exact des entrées et des sorties de potassium et de sodium peuvent nous donner un renseignement exact à ce sujet et confirmer les théories de Bunge qui, d'ailleurs, désirait que de semblables expériences soient faites. Nous ne possédons pas d'expériences de ce genre, dit-il, nous ne savons jusqu'à quel point l'organisme continue à abandonner du sodium sous l'influence d'une absorption continue de potassium. On ne peut douter que la limite soit bientôt atteinte, au delà de laquelle l'organisme retient énergiquement ce qui lui reste de sodium.

Forster et Kemmerich, puis Kurtz, ont réfuté les théories de Bunge par des expériences dont ce dernier montra la non-valeur. Puis Lapicque et Fredericq opposèrent à Bunge ce fait découvert par Dibowsky et Demoussy, à savoir que des nègres de

l'Afrique centrale salaient leurs aliments avec un condiment uniquement potassique. Les sels de Berberati, du Congo, de l'Angoniland, sont, en effet, presque uniquement composés de sels de potassium. Comment concilier deux faits aussi discordants, disaient-ils, que cet emploi de sels de potassium et la théorie de Bunge? Les nègres, en effet, ne peuvent pas se procurer de sel de sodium et ils ne s'en soucient même pas. Quinton finalement reconnaît avec Bunge que les animaux végétariens ont, en effet, faim de chlorure de sodium, mais pour lui la cause est toute différente; ce n'est pas parce que les sels de potassium soutirent le sodium de l'organisme, mais tout simplement parce que le régime végétarien est pauvre en sodium d'une façon absolue.

La réfutation de Lapicque et Fredericq n'a pas grande valeur car elle ne repose pas sur des faits précis. Les indigènes salent bien leurs aliments avec une substance potassique, mais quels sont les sels contenus dans les végétaux servant d'aliment? Ceux-ci renferment peut-être une proportion notable de sodium capable de compenser les pertes. Bunge a démontré qu'une alimentation contenant 6 de K pour 1 de Na est suffisante. Nul ne peut dire si les nègres de l'Afrique centrale n'absorbent pas la quantité nécessaire minima de sodium. D'autre part, nous ne répondrons à la théorie de Quinton que par les faits qui suivent et démontrent l'action nettement antisodique des sels de potassium.

Deux jeunes chiens nouveau-nés sont lentement acclimatés à deux régimes différents, l'un végétarien, l'autre carnivore. D'après les dosages faits sur les aliments, nous arrivons à donner au végétarien 22 fois plus de potassium que de sodium, tandis que le carnivore reçoit seulement 2,8 fois plus de potassium que de sodium; au bout d'un mois et demi on exagère les régimes en ajoutant du potassium à la nourriture du végétarien et du sodium à la nourriture du carnivore. Au bout de trois mois, les deux chiens sont tués. Pendant le cours des expériences on a prélevé 3 fois du sang, et on a dressé deux bilans exacts de l'entrée et de la sortie des alcalins. Après le sacrifice des deux chiens, on a procédé à l'analyse du foie et des reins.

a) Le sang reste remarquablement constant dans sa compo-

sition minérale, l'organisme lutte avec succès contre cette invasion de potassium et parvient à maintenir son sang intégral. Le sang du carnivore ne subit aucune modification importante.

b) Le chien qui reçoit l'alimentation végétarienne riche en potassium voit sa croissance arrêtée, bien qu'il reçoive tous les éléments nécessaires à l'édification de son organisme : albumine, hydrate de carbone, sels minéraux, graisse, etc. L'influence empêchante des sels de potassium sur sa croissance semble donc se manifester. Par quel mécanisme?

c) Les deux bilans nous renseignent à ce sujet. Dans les deux cas, les bilans faits sur le végétarien nous montrent une sortie de sodium plus forte que l'entrée. Donc, bien que presque complètement privé de sodium, l'animal en rejette plus qu'il n'en reçoit, alors qu'il devrait au contraire le retenir avec force. Cette élimination ne peut être attribuée qu'à l'abondance de phosphate de potassium ingérée, agissant selon le mécanisme indiqué par Bunge.

d) Comme cette perte de sodium ne porte pas sur le sang, qui reste identique à lui-même, elle porte évidemment sur les tissus. L'analyse du foie et des reins confirme cette hypothèse. Les organes des végétariens, comparés avec ceux d'un chien normal et ceux d'un chien carnivore, montrent un net affaiblissement du taux en sodium ; tandis que le taux en potassium reste remarquablement constant. Car s'il est possible d'abaisser la teneur en sodium de l'organisme, il paraît impossible d'élever le taux en potassium au-dessus de celui fixé par la nature.

Ces quatre faits concordent avec la théorie de Bunge ; néanmoins, il nous a paru utile de les appuyer d'une autre expérience, en opérant sur de petits animaux dans lesquels nous pourrions doser le potassium et le sodium de l'organisme total.

Nous avons pris trois lots de Souris blanches composés chacun de trois Souris. Au premier lot, nous donnons du Blé simple. Au second lot, du Blé concassé et arrosé d'une solution PO^4HK^2 ; au troisième lot, du Blé concassé et arrosé de NaCl. Le dosage des alcalins dans ces différentes alimentations est édifiant. Le lot touchant le Blé potassique reçoit 0 gr. 0009

de Na pour 0 gr. 0656 de K. Le lot touchant le Blé sodique reçoit 0 gr. 0402 de Na pour 0 gr. 0080 de K. Grâce à la résistance de ces petits animaux, on est arrivé à réaliser des régimes presque exclusifs. Etant donné qu'une Souris mange environ 5 grammes de Blé par jour et que celle-ci pèse 15 grammes, elle absorbe 6 gr. 560 de potassium par kilogramme d'animal et par jour; tandis que le Chien n'ingérait que 0 gr. 4765 de potassium par kilogramme d'animal. Dans ces conditions, nous pouvons manifester d'une façon plus nette encore l'action désodifiante des sels de potassium.

Les Souris nourries au Blé potassique succombent au bout de quelques semaines à ce régime. Le corps de ces dernières, analysé, a montré un abaissement très net de la teneur en sodium. Nous donnons ici la valeur des rapports $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$.

Premier lot (K)	2.41
Deuxième lot (Na)	1.54
Troisième lot témoin	1.47

Quelle que soit la richesse en potassium de l'alimentation, on n'arrive pas à modifier le taux potassique de la composition minérale. Une autre conclusion s'impose : le potassium est un déminéralisant, puisqu'il soutire le sodium de l'organisme sans le remplacer. Nous voyons, en effet, que les Souris nourries au potassium sont moins minéralisées, mais, contrairement à notre attente, ce sont surtout les cendres insolubles qui ont fléchi.

Peut-être y aurait-il une action du potassium sur la mauvaise assimilation ou la désassimilation des sels de calcium. On peut, en outre, conclure qu'une vie sans sodium, ou tout au moins sans un taux minime de sodium, est impossible; conclusion qui vient absolument à l'encontre des suppositions de Lapicque, de Fredericq, etc., au sujet des Congolais, puisque ces auteurs prétendaient voir en ces nègres les exemples d'organismes ne recevant que du potassium sans en souffrir d'aucune façon.

Influence du milieu et de l'alimentation sur la composition minérale des êtres vivants au point de vue de la teneur en potassium et en sodium. — Comme les expériences précédentes

nous avaient démontré la plasticité minérale de la matière vivante, nous avons voulu voir si une lente acclimatation à un régime fortement potassique ou fortement sodique ne produirait pas les mêmes modifications que nos brèves expériences de laboratoire, qui avaient duré à peine quatre mois. Cette lente acclimatation étant trop difficile à réaliser expérimentalement, il nous a paru plus facile de nous adresser à des animaux vivant normalement dans des milieux différents. Les animaux modifient profondément leurs organes en vue de l'alimentation à laquelle ils sont destinés; il est tout naturel d'admettre qu'à ces variations morphologiques viennent se superposer des variations chimiques, et, de même qu'en des cas de mimétisme fréquent nous voyons l'animal devenir le véritable reflet du milieu où il vit, de même nous devons voir la composition des organismes devenir, elle aussi, un reflet du milieu minéral qui les nourrit. Dans le monde, deux milieux se distinguent nettement par leur richesse relative en potassium et en sodium. Bunge, dans son Cours de chimie biologique, nous en énonce magistralement les raisons : « Jetons un coup d'œil, dit-il, sur la distribution des deux alcalis, soude et potasse, à la surface du globe. Dans la lutte entre l'acide silicique et l'acide carbonique pour la possession des bases, ce dernier présente une plus grande affinité pour la soude, tandis que le premier s'allie plus volontiers à la potasse. La désagrégation des roches siliciques donne naissance à du carbonate de soude, qui se dissout dans l'eau et filtre avec elle vers les profondeurs. La potasse reste avec d'autres bases, surtout avec l'argile unie à la silice à la surface de la terre sous la forme d'un sel insoluble. Le carbonate de soude arrivant à la mer se transforme sous l'action des chlorures des terres alcalines; il se forme du chlorure de sodium et des carbonates terreux insolubles qui se déposent lentement et forment des montagnes entières de pierre calcaire, de craie, de dolomie. C'est pourquoi l'eau de mer est riche en chlorure de sodium, pauvre en sels de potasse, et la surface de la croûte terrestre riche en sels de potasse, pauvre en sel de cuisine. » Nous devrions nous attendre à trouver une uniformité presque absolue dans la composition minérale d'individus vivant dans le même milieu. L'expérience nous apprendra que nous trouverons de grandes différences chez des animaux

marins, tandis que certains animaux terrestres ou d'eau douce se rapprocheront, sans raison apparente, d'animaux vivant dans la mer. Il entre en jeu une quantité de facteurs tendant à modifier la composition minérale d'un individu, dont un des principaux est l'alimentation. Et, tout d'abord, le milieu lui-même, la mer par exemple, n'exerce pas également son influence sur tous les organismes qui vivent dans son sein. Les Oursins, les Astéries sont littéralement baignés d'elle ; chaque organe trempe dans le milieu marin et subira bien plus l'influence du milieu que les organes d'un Poisson quelconque complètement isolé du milieu marin où il nage. L'Écrevisse vivant dans l'eau douce ne subira que légèrement l'influence de ce milieu, lui étant complètement fermée, et sa composition minérale tendra à se rapprocher de celle des animaux marins de la même famille. Donc, si l'on peut admettre qu'en général un animal vivant dans le milieu marin a un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ plus faible qu'un animal vivant dans le milieu terrestre, il ne faudra pas non plus s'étonner de certaines anomalies causées par les multiples raisons que nous venons d'énumérer.

Nos recherches ont évidemment porté sur la valeur du rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ chez différents animaux. Nos analyses ont toujours été faites sur l'animal entier. A ce sujet, nous n'admettons pas la théorie de Quinton, qui ne trouve d'intérêt qu'aux analyses du milieu vital (la lymphe, le plasma) des animaux. Quinton avait raison pour le cas particulier qui l'intéressait : démontrer la constance du milieu vital dans sa teneur en chlore. Cette loi eût été impossible à démontrer, s'il avait analysé des animaux entiers et avait rapporté au poids total le poids de chlore trouvé. Mais comme toutes les parties du corps d'un individu doivent se ressentir des différences de teneur minérale de l'alimentation, puisque toutes ces parties, même chez les animaux à coquille, sont reliées entre elles par le milieu nutritif commun dans lequel elles vont chercher les matériaux de construction, et comme nous envisageons le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ et non pas le rapport du potassium et du sodium au poids frais ou aux cendres totales, nos analyses

sur les animaux entiers conservent ainsi toute leur valeur.

Nous avons choisi des animaux dans les différents embranchements suivants :

Les Stellérides, les Echinides, les Arthropodes, les Vers, les Mollusques, les Vertébrés.

Dans chaque embranchement, nous avons choisi, autant que possible, des représentants vivant dans la mer, dans l'eau douce et sur la terre. Parmi les vertébrés, nous avons pris des animaux nettement végétariens et nettement carnivores.

1° Les Stellérides et les Echinides nous ont fourni des animaux très riches en sodium et très pauvres en potassium ; les tissus des Oursins et des Etoiles de mer ont une composition minérale qui tend à se rapprocher de celle du milieu marin qui les pénètre. Le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ varie entre 0,34 et 0,41.

2° Dans l'embranchement des Arthropodes, nous avons étudié deux classes : 1° les Crustacés ; 2° les Insectes.

Dans la première classe, nous avons choisi des représentants marins et des représentants d'eau douce (*Crangon*, *Astacus*, *Gammarus*). Tous ont un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ à peu près semblable (0,90). L'eau douce ne paraît avoir eu aucune influence sur la désodification de ces animaux.

Les Insectes, qui sont par excellence des animaux à habitat terrestre, nous ont donné des chiffres très intéressants. Le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ s'élève considérablement, en effet. Les *Gyrins* ont un rapport égal à 2,1, les *Locusta* égal à 3,6, les *Pieris* à 2,6 ; généralement chez les *Chelonia* il atteint 14,2 et 15,9. Ces Invertébrés ont une composition minérale identique à celle des plantes dont ils se nourrissent. L'adaptation au milieu et à l'alimentation terrestre est donc très sensible chez les Arthropodes, puisque l'on voit le rapport passer de 0,9 à 15,9.

3° Chez les Vers, l'influence du milieu terrestre se fait aussi sentir. L'*Hirudo* a un rapport égal à 0,72, tandis que le *Lumbricus* a un rapport égal à 2,07.

4° Chez les Mollusques, il en est de même. Les Mollusques

marins (*Cardium*, *Mytilus*), les Mollusques d'eaux douces (*Unio*, *Planorbis*, *Limnea*), ont un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ qui oscille entre 0,24 et 0,87, tandis que les Mollusques terrestres, tels que l'*Helix* ou *Limax*, ont des rapports respectivement égaux à 2,1 et 4,1.

5° Chez les Vertébrés, la plasticité minérale se manifeste beaucoup moins grande. Quel que soit le Vertébré auquel on s'adresse, fût-il Reptile, Batracien ou même Poisson vivant dans l'eau de mer, on n'obtient jamais de rapport inférieur à l'unité. *Clupea*, *Gobio*, *Triton*, ont des rapports respectivement égaux à 1,4, 1,36, 1,09. Quant aux Vertébrés, complètement adaptés à la vie terrestre, ils ont un rapport plus fort, mais ce rapport n'atteint pas les valeurs rencontrées dans d'autres groupes. *Rana* a pour rapport 2,00 ; *Cerastes vipera* 1,4, *Turtur* 1,8, *Mus* 1,8, *Canis* 1,5. Le rapport le plus fort appartient au Cobaye qui a une alimentation très riche en potassium. Cet animal a pour rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ de l'organisme entier 2,7, tandis que le Syrnium, Oiseau nettement carnivore, a pour rapport 1,4.

Si nous envisageons maintenant la question, en dehors de tous groupements, exception faite pour les Vertébrés qui maintiennent beaucoup plus constante leur composition minérale, malgré l'extrême variation des ressources minérales des milieux qu'ils habitent, nous pouvons dire que tout organisme vivant dans le milieu marin ou dans l'eau douce a une teneur minérale dont le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ est inférieur à 1,00 ; nous pouvons dire aussi que tout organisme vivant dans le milieu terrestre a une teneur minérale dont le rapport est supérieur à 1,5. Les deux dernières règles énoncées, pour avoir force de lois, doivent reposer sur un bien plus grand nombre d'expériences. Nous n'avons pu faire là qu'un travail d'orientation, la mise au point d'une pareille entreprise demanderait un long temps d'études. C'est pourquoi nous ne voulons pas donner ces règles comme absolues. Espérons que si d'autres analyses sont faites, elles ne feront que confirmer ce qui vient d'être énoncé.

Variations des teneurs en potassium et en sodium de différentes sécrétions

Pour compléter l'étude du potassium et du sodium dans l'organisme, il nous restait à examiner la composition de diverses sécrétions et en particulier des sécrétions digestives. On a beaucoup étudié les différents sucs digestifs, tant au point de vue du mécanisme de leur sécrétion qu'au point de vue de leurs actions diastasiques, mais peu de physiologistes se sont attachés à en connaître d'une façon exacte la composition minérale. Cette étude a pourtant une grande importance, car on peut en tirer des conclusions intéressant le mécanisme des actions diastasiques. Pour rester dans le cadre de notre sujet, nous nous sommes attachés à connaître la teneur en potassium et en sodium des sécrétions différentes, et à en suivre les variations sous diverses influences. Mais il serait à souhaiter que les analyses se rapportant aux autres composés minéraux vinssent compléter ce travail amorcé. Les quelques auteurs qui se sont jusqu'ici intéressés à ces questions ont presque toujours négligé un côté de la question, soit la partie physiologique, soit la partie chimique ; et les différences considérables que nous trouvons dans la littérature chimique, dans les analyses d'une même sécrétion, proviennent souvent de ce que les chimistes ont recueilli les sucs dans des conditions différentes : alimentation différente, technique opératoire imparfaite faisant donner à une même glande des sécrétions dissemblables. Il importe donc de donner avec beaucoup de précision tous les détails des conditions dans lesquelles on a recueilli le produit à analyser. Je dois ici remercier M. Frouin, qui m'a obligeamment fourni les divers sucs que j'ai analysés ou indiqué les méthodes de choix pour obtenir ces diverses sécrétions, me faisant bénéficier ainsi de sa longue expérience d'expérimentateur et de physiologue averti.

Suc gastrique. — Pour obtenir du suc gastrique pur, il nous fallait isoler l'estomac en entier ou tout au moins une partie de l'estomac. En pratiquant l'opération de Pawlow-Chiguin, c'est-à-dire en isolant un lambeau de l'estomac, on n'a qu'une partie seulement de la sécrétion gastrique qui ne correspond pas à la

sécrétion normale. En effet, les parois voisinantes du cardia et les parois de la grande courbure ont une sécrétion acide, tandis que les parois voisinantes du pylore ont une sécrétion alcaline. Il faut donc, si l'on veut une sécrétion normale, isoler complètement l'estomac en sectionnant au cardia et au pylore et raccordant l'œsophage au duodénum.

Un Chien, dont l'estomac est isolé depuis un mois, reçoit une alimentation composée de viande dessalée par ébullition dans l'eau et de riz. A ce régime on ajoute 10 grammes de NaCl par jour. La sécrétion gastrique est normale dans ces conditions, 500 cent. cubes par jour. On le prive de NaCl, aussitôt la sécrétion diminue et, au bout de six jours, elle tombe à 95 cent. cubes. On procède alors à une analyse de suc gastrique. On change le régime, on redonne du NaCl, aussitôt la sécrétion remonte et redevient normale. On analyse à nouveau le suc. Pendant toute la durée de l'expérience nous avons suivi l'élimination du chlore total et de l'acide chlorhydrique libre. Nos résultats ont confirmé ce que Frouin avait déjà nettement indiqué dans une communication à la Société de Biologie en 1899. Seuls le chlore libre et le chlore fixe sont modifiés. A une alimentation riche en NaCl correspond un suc gastrique riche en HCl libre et renfermant peu de chlore fixe ; à une alimentation pauvre en NaCl correspond un suc très peu acide dont les chlorures fixes augmentent, c'est-à-dire que le potassium et le sodium éliminés s'accroissent. *Dans tous les cas le chlore total reste fixe.*

Il y avait donc intérêt à suivre la variation du Na et du K en changeant la base du chlorure de l'alimentation. Nous avons remplacé pendant deux jours le NaCl par du KCl, puis par du $CaCl^2$.

Sous l'influence des chlorures, l'acidité du suc gastrique est élevée, quelle que soit la base, et les bases éliminées sont faibles. Le Ca, le K ou le Na ajoutés n'influencent pas non plus la qualité des bases éliminées, qui restent toujours dans le même rapport. Le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ oscille entre 0,200 et 0, 300, le calcium reste remarquablement fixe. Mais lorsque l'on prive le Chien de NaCl et que l'on augmente ainsi l'élimination des chlorures fixes (rapporter au litre bien entendu et non à vingt-

quatre heures), c'est uniquement l'élimination du sodium qui se trouve augmentée tandis que le potassium reste fixe. Le suc gastrique analysé dans le cas du Chien privé de NaCl et n'éliminant plus que 96 cent. cubes par vingt-quatre heures a un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ égal à 0,067 ; tandis que le suc éliminé sous l'influence des 10 grammes de NaCl par jour a un rapport égal à 0, 235.

Bile. — Le premier échantillon de bile examiné était de la bile normale sécrétée par un Chien à l'état de jeûne depuis vingt-quatre heures et obtenue par simple évacuation de la vésicule au moment de l'établissement de la fistule temporaire du canal cholédoque. Le second échantillon provenait de la bile sécrétée après l'opération, sous l'influence d'injection de sécrétine au Chien. Cette seconde bile, comme d'ailleurs l'ont déjà trouvé beaucoup d'auteurs, est beaucoup plus diluée que la première et renferme un pourcentage de K et de Na moins fort.

Néanmoins le Na a moins subi cette influence, et nous constatons un abaissement du rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$. La bile de la vésicule a un rapport de 0,132, tandis que la bile fistulaire a un rapport égal à 0,100.

Salive. — Nous avons d'abord analysé de la salive normale mixte de Chien, en la puisant à l'aide d'une pipette dans la gueule tenue ouverte par un mors. Puis nous avons recueilli des salives pures des différentes glandes. A cet effet, il a été pratiqué une fistule parotidienne et une fistule sous-maxillaire. Au bout de huit jours, après complète guérison, on excita la sécrétion salivaire en badigeonnant la gueule du Chien avec de l'acide acétique dilué au cinquantième. On recueillait alors la salive à l'extérieur dans un tube à essai, en appliquant celui-ci contre l'ouverture de la fistule.

La salive mixte normale a une teneur en potassium plus élevée que les deux autres; la salive acétique de la parotide et celle de la sous-maxillaire ont une teneur en potassium à peu près égale, mais la teneur en sodium augmente notablement dans les salives acétiques. Ce fait est d'accord avec la théorie de Pawlow, qui constate la sécrétion d'un alcali neutralisant lorsque l'on excite les glandes salivaires par un acide. Le rapport

$\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ diminue donc dans les deux échantillons de salive acétique. La salive mixte normale a un rapport égal à 0,90, la parotidienne acétique un rapport de 0,27 et la sous-maxillaire de 0,39.

Suc pancréatique. — La sécrétion pancréatique a été étudiée sur deux animaux : le Chien et la Vache. Chez le Chien, on a pratiqué une fistule temporaire pancréatique, et on a recueilli le suc sécrété sous l'influence d'injection de sécrétine. On a fait à la Vache une fistule permanente et on a recueilli à deux reprises différentes du suc pancréatique normal. La Vache donne normalement six litres de suc pancréatique par vingt-quatre heures. L'animal pendant cette expérience a toujours reçu la même alimentation. Les compositions de ces liquides se rapprochent beaucoup les unes des autres, et l'on ne trouve pas chez le Chien l'augmentation sodique habituelle, quand on provoque artificiellement une sécrétion abondante. Il est vrai que nous n'avons pas le seul terme de comparaison valable, qui serait le suc pancréatique normal de Chien, très difficile à obtenir en quantité suffisante pour faire une analyse des alcalins. Le suc pancréatique de Chien a pour rapport 0,124 ; celui de Vache 0,090.

Suc intestinal. — Le suc intestinal que nous avons analysé vient de trois Chiens, opérés depuis trois ans, auxquels on a fait une fistule permanente duodéno-jéjunale de Thiry. Le suc est le résultat de sécrétions spontanées, qui se sont produites de trois à sept heures après le repas. Ce suc a été ensuite centrifugé pour le débarrasser d'éléments cellulaires. Les résultats que nous avons trouvés ne sont nullement comparables à ceux de Schmidt et Zander, car ceux-ci ont étudié un suc impur, provenant d'une simple fistule intestinale. Ce suc était donc mêlé à de la bile et à du suc pancréatique. Seule notre analyse, portant sur du suc intestinal sécrété par une anse isolée et débarrassé d'éléments cellulaires par centrifugation, donne une idée exacte de la composition minérale du suc pur.

D'après ces analyses, nous voyons que le sodium est le métal qui forme la base la plus importante de toutes les sécrétions, exception faite pour la salive mixte normale et pour le lait de certains animaux recevant une nourriture riche en potassium

(analyses Bunge). Le sodium représente, dans la majorité des cas, 30 p. 100 des cendres totales environ; si nous le supposons allié au chlore, il représente donc à peu près 80 p. 100 des cendres totales. Le potassium joue après lui le rôle le plus important, tout au moins comme valeur quantitative. Il représente 3 à 4 p. 100 des cendres totales. Le potassium se trouve dans un rapport assez constant avec le sodium dans les sécrétions normales. Ce rapport oscille entre 0,19 et 0,09. Si l'on calcule le pourcentage de potassium rapporté au poids frais, toujours dans des sucs normaux, on voit aussi qu'il est peu variable; ce pourcentage oscille entre 0,077 et 0,039. Il en est de même pour le sodium.

Les sécrétions ont, par contre, une composition minérale très plastique lorsqu'elles ne sont plus normales, et l'on peut faire varier aisément le rapport du potassium au sodium en produisant artificiellement des sécrétions abondantes. Cette variation se traduit toujours par un abaissement du rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$, une élimination plus grande de sodium accompagnant toujours ces sortes de sécrétions.

Action antitoxique du sodium sur le potassium.

Nous avons, dans ce dernier chapitre, essayé de répéter les expériences que Lœb a faites sur le *Fundulus*, poisson complètement insensible à de très grandes variations de pression osmotique. Lœb place ces poissons dans des aquariums contenant une solution de chlorure de potassium dont la concentration toxique a été fixée par des expériences précédentes. Notons en passant que le *Fundulus* meurt dans une solution contenant uniquement une quantité de potassium équivalente à celle que contient la mer. Dans chaque bocal, Lœb ajoute une quantité croissante de chlorure de sodium. Quand le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ atteint 1/17 environ, le poisson résiste à l'action toxique du potassium grâce à l'action antitoxique du sodium. Nous avons donc pensé répéter ces expériences dans des conditions différentes afin de voir si le Na se montrait toujours aussi nettement antitoxique du K.

1° *Action antitoxique du sodium sur le potassium en injections sous-cutanées.* — Nous avons opéré sur des souris blanches, qui supportent merveilleusement l'injection de grandes quantités de liquide isotonique, voire même hypertonique. Une souris de 15 grammes peut recevoir, sans en souffrir, 4 cent. cubes de sérum hypotonique, isotonique ou hypertonique. Il est néanmoins difficile de fixer exactement une limite de toxicité du potassium au kilogramme d'animal, car il est difficile d'injecter, à 1/10 de centimètre cube près, une solution de Na dans le corps d'une souris, et le coefficient de résistance individuelle est variable chez des animaux de même âge et de même poids.

De nombreuses expériences nous ont montré, de plus, fait non encore signalé à ma connaissance, qu'il est de toute importance de fixer la concentration de la solution injectée. Un même poids de métal n'a pas une égale toxicité en solution hypotonique, isotonique et hypertonique. Les propriétés toxiques qui sont à leur maximum en solution hypotonique s'atténuent dans des proportions notables en isotonie et en hypertonie. Les quelques chiffres qui suivent vont fixer les idées. Par conséquent, une limite de toxicité n'est valable que lorsqu'elle est fixée par un grand nombre d'expériences, cette limite se rapportant à une concentration définie du liquide et à des animaux de même âge et de poids sensiblement égaux. Si ces différents auteurs avaient eu soin de mentionner leurs résultats sous cette forme, il est probable que nous ne trouverions pas, dans la littérature, les énormes différences qui séparent des limites de toxicité trouvées par différents auteurs pour un même corps et pour un même animal.

Une souris blanche de 15 grammes est tuée en une demi-heure environ lorsqu'on lui injecte sous la peau 0 gr. 694 de potassium par kilogramme, en solution hypotonique correspondant à la demi-isotonie, c'est-à-dire 4,5 de NaCl par litre.

Une souris de 15 grammes est tuée par 0 gr. 963 de potassium par kilogramme d'animal en solution isotonique.

Une souris de 15 grammes est tuée par 1 gr. 28 de potassium par kilogramme d'animal en solution hypertonique correspondant à une solution contenant 18 grammes de NaCl par litre.

Le potassium est toujours injecté sous forme de chlorure.

Nous avons recommencé nos expériences sur la grenouille, qui est tuée par 0 gr. 344 de potassium par kilogramme en isotonie, et par 0 gr. 458 de potassium par kilogramme en hypertonie.

La grenouille, qui supporte bien le sodium et l'hypertonie et qui, de plus, est sensible au potassium, est un bon sujet d'expérience. Nous avons injecté, en même temps que la dose toxique minima en hypertonie de potassium égale à 0 gr. 458 par kilogramme d'animal, des quantités croissantes de sodium jusqu'à 1 gr. 97 par kilogramme, ce qui représente presque cinq fois plus de sodium que de potassium. Nous n'avons jamais eu, malgré cette addition, le moindre retard dans la mort des animaux, qui périssaient tous au bout d'une demi-heure, comme s'ils avaient été simplement injectés au potassium. Les expériences ont été négatives aussi chez les souris. On pourra nous objecter que jamais la dose de sodium n'a été assez forte et n'a jamais approché celle que Lœb ajoutait aux solutions potassiques dans lesquelles il faisait vivre ses poissons. Nous répondrons à cela que dès que Lœb ajoutait de faibles quantités de sodium, bien inférieures à la quantité optima, il constatait des diminutions dans le nombre des poissons morts, qui commençait ainsi à manifester les propriétés antitoxiques de ce métal. Nous n'avons jamais rien eu de comparable dans nos résultats.

2° *Action antitoxique du sodium sur le potassium poison du cœur.* — Nous avons cherché à manifester l'action antitoxique du sodium sur le potassium par d'autres expériences. Pour cela, nous avons calqué les travaux de Richet sur le cœur de la grenouille, lorsque ce physiologue cherchait à déterminer l'action des alcalins sur cet organe.

On met à nu le cœur d'une grenouille, en prenant soin d'enlever le péricarde. Le cœur continue à battre très régulièrement pendant plusieurs heures si on l'abandonne à lui-même. Richet a montré qu'en versant sur ce cœur quatre gouttes d'une solution renfermant 52 gr. 5 de potassium par litre, on obtient un arrêt immédiat et sans reprise des battements. Si l'on verse une solution ne contenant que 26 grammes de potassium sous forme de chlorure par litre et ajoutant quatre gouttes de la solution tous les quarts d'heure, on obtient un arrêt au bout de la quatrième addition.

Nous avons essayé l'action combinée des sels de potassium et de sodium comparés à l'action des sels de potassium seuls. Nous n'avons obtenu d'arrêt du cœur, avec la solution contenant 52 grammes de K par litre et 78 grammes de Na, qu'au bout de la troisième addition de quatre gouttes. Avec la solution contenant seulement les 52 grammes de K, nous avons eu toujours l'arrêt instantané, en diastole. Si nous admettons que, dans la première série d'expériences, il ne nous a pas été possible d'ajouter des quantités suffisantes de sodium pour montrer ses propriétés antitoxiques, et que nous nous appuyons seulement sur les expériences du cœur de la grenouille, nous voyons que, chez les mammifères, le sodium a une légère action antitoxique sur le potassium. Mais cette action ne se manifeste que lorsque le sodium est en proportion notable comparativement au potassium. Or, les nombreuses analyses d'animaux nous ont montré que jamais le sodium n'existe dans ces proportions dans l'organisme et qu'il lui arrive même, dans certains cas, d'en être complètement absent (chenille). Donc, parmi tous les rôles importants que peut jouer le sodium, il est probable qu'il ne joue pas le rôle antitoxique vis-à-vis du potassium. Il peut d'ailleurs être suppléé par d'autres métaux beaucoup plus actifs que lui, tels que le calcium, dont le pouvoir antitoxique sur le potassium a déjà été étudié.

Conclusions générales.

Il nous reste, à la fin de ce mémoire, à mettre en valeur, en les groupant, les conclusions générales déjà énoncées à la fin de chaque chapitre :

1° Après une étude critique, précise et détaillée des procédés d'analyse du potassium et du sodium, nous avons pu donner une méthode de recherches nous donnant l'approximation, à 2 p. 100 près, et par conséquent exempte de tous reproches ;

2° Au point de vue de la répartition du potassium et du sodium dans l'organisme, on peut conclure à l'absence totale de spécificité absolue du potassium ou du sodium pour tel organe ou tel tissu. Les deux alcalis sont répartis, inégalement il est vrai, dans tous les organes du corps des animaux ;

3° Un classement rationnel de ces organes ne peut se faire que d'après le rapport du potassium au sodium et non d'après le rapport du métal au poids frais. De ce classement, il résulte que les tissus à fonction importante, riches en cellules, ont un rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ plus élevé que les tissus de conduction et de soutien. Donc, si le sodium est un élément circulant, il ne faut pas définir le seul potassium comme élément cellulaire, le premier métal, en effet, étant lui-même un élément cellulaire plus important que le potassium dans certains tissus ;

4° La variabilité de la composition minérale de l'organisme est assez grande en ce qui concerne tout au moins le potassium et le sodium. Ce fait a été démontré en faisant varier les alcalis du sang par la saignée, en modifiant la composition des sécrétions par excitation des glandes à l'aide d'un agent artificiel, en changeant la teneur minérale des tissus pris séparément et de l'organisme entier, par des alimentations appropriées. Seul, le sang paraît conserver intégralement son taux de potassium et de sodium, malgré les écarts de régime et les additions de NaCl ou de phosphate de potassium aux aliments. Nous assistons donc à ce fait extraordinaire de la variation minérale de tissus qui se nourrissent et se baignent dans un liquide de composition constante ;

5° Des bilans, établis d'une façon aussi précise que possible, ont nettement montré que la théorie de Bunge, qui attribuait la faim de sel à l'ingestion de potassium, était exacte. Les animaux, en effet, sous l'influence du potassium, perdent plus de sodium qu'ils n'en absorbent, et, bien que vivant en inanition sodique, ils éliminent ce métal qu'ils devraient logiquement conserver avec force, d'où amaigrissement, et parfois mort. L'organisme a donc besoin de sodium, et l'histoire des Congolais, ne vivant que d'une alimentation purement potassique, est infirmée par la suite de nos expériences sur la nécessité du sodium dans l'alimentation ;

6° Il ne nous a pas été possible, en opérant par injections sous-cutanées, de démontrer d'une façon nette l'action antitoxique du sodium sur le potassium, et de faire ainsi une généralisation des travaux de Lœb. Un seul fait est à retenir : une solution contenant une même quantité de métal devient

de moins en moins toxique par rapport au kilogramme d'animal lorsqu'elle passe de l'hypotonie à l'hypertonie ;

7° Finalement, nous avons montré que la teneur en métaux alcalins des différents animaux se modifiait selon le milieu et l'alimentation. Exception étant faite pour les Vertébrés, animaux supérieurs, nous pouvons dire que le rapport $\frac{\text{potassium}}{\text{sodium}}$ de la matière vivante s'élève, lorsque celle-ci, quittant la mer et les eaux douces, s'adapte à la vie terrestre et à son alimentation.

RECHERCHES SUR LE MANGANÈSE NORMAL DU SANG

par GABRIEL BERTRAND et F. MEDIGRECEANU.

En raison de son importance physiologique et médicale et des difficultés qui ont surgi lorsqu'on a voulu la résoudre, la question de la présence normale du manganèse dans le sang de l'homme et des animaux supérieurs a donné lieu à des recherches nombreuses et contradictoires.

S'il est encore facile, en effet, dans beaucoup de cas, de déterminer la présence et même le poids d'un élément, métalloïde ou métal, dont on ne peut avoir à sa disposition qu'une très petite quantité, il n'en est plus ainsi lorsque cet élément est accompagné d'une énorme proportion de substances étrangères, minérales ou organiques. Ou bien, dans ce cas particulier, fréquent en chimie biologique, on court le risque de perdre l'élément cherché, soit en partie, soit en totalité, au cours des manipulations; ou bien, au contraire, on court celui d'en introduire dans le mélange soumis à l'analyse parce que cet élément existe parfois, sans qu'on s'en doute, à l'état d'impureté dans la masse des réactifs dont on est obligé de se servir. Si on le perd, on est conduit à méconnaître son existence; si, au contraire, on en introduit, on peut être amené à admettre sa présence, lors même que la quantité reconnue ou dosée aurait été apportée exclusivement par les réactifs. L'histoire de la découverte de l'arsenic normal dans l'organisme humain a déjà démontré la justesse de ces observations (1); celle de la recherche du manganèse dans le sang, dont nous venons de nous occuper, en fournira une confirmation nouvelle et non moins instructive.

La première indication relative à la présence du manganèse dans le sang a été donnée par Wurzer (2), en 1830. En oxy-

(1) GABRIEL BERTRAND, *Ann. Chim. Physiq.*, 7e série, t. XXIX, p. 242 (1903) et *Bull. Soc. Chim.*, 3e série, t. XXIX, p. 920 (1903). — G. BERTRAND et Z. VAMOSSY, *Ann. Chim. Physiq.*, 8e série, t. VII, p. 523 (1906).

(2) *Schweigger's Journal d. Chem. Physiq.*, t. LVIII, p. 481 (1830).

dant par le nitrate de potassium 2 grammes de charbon préparé dans un creuset à partir du sang humain, puis en reprenant le résidu lavé par l'acide chlorhydrique, il a obtenu une solution dans laquelle l'action successive du succinate d'ammonium et du carbonate de sodium lui a permis de séparer :

Oxyde de fer	0,108
Sesquioxyde de manganèse	0,034

soit une proportion de manganèse égale au tiers environ de celle du fer.

Marchessaux, selon Riche (1), aurait émis, en 1844, une opinion semblable à celle de Wurzer, sans indiquer toutefois la proportion de métal contenue dans le sang.

A son tour et sans connaître, sans doute, ces publications, Millon annonça, en 1848, que « le sang de l'homme contient constamment de la silice, du manganèse, du plomb et du cuivre ».

Pour rechercher ces éléments, Millon opérait de la manière suivante : le sang dilué de trois volumes d'eau était introduit dans un flacon de chlore gazeux qui le coagulait et détruisait les globules. On filtrait ; on évaporait le liquide et on calcinait quelques instants le résidu pour faire disparaître la petite quantité de matière organique que le chlore n'avait pas précipitée. La partie insoluble des cendres était ensuite traitée « comme un minerai » ; elle contenait, entre autres éléments, de 10 à 24 p. 100 de manganèse.

Après avoir conclu que les éléments ainsi découverts se fixent, avec le fer, dans les globules et participent comme lui à l'organisation et à la vie, Millon admit la possibilité d'une chlorose par défaut de cuivre, de plomb ou de manganèse ou bien, au contraire, celle de quelque affection obscure et rebelle par excès de ces métaux, et il invita les médecins à examiner ces questions (2).

Les résultats et les conclusions de Millon furent vivement critiqués l'année même par Melsens. Ayant trouvé qu'en opérant avec des réactifs purs on ne pouvait déceler dans le sang

(1) *Journ. Pharm. chim.*, 4e série, t. XXVII, p. 542 (1878).
(2) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. XXVI, p. 41 (1848). Aussi : *Ann. Chim. Physiq.*, 3e série, t. XXIII, p. 372 et p. 508 (1848).

ni cuivre, ni plomb, Melsens émit des doutes sur la précision des expériences de Millon et, sans nier absolument la présence du manganèse à propos duquel il n'avait pas fait de recherche particulière, il se refusa à croire à ses proportions élevées et à son importance physiologique (1).

Les critiques de Melsens étaient capables de faire ressortir l'insuffisance des expériences de Millon, elles ne pouvaient infirmer leur valeur, au moins qualitative, en ce qui concerne le manganèse. De nombreuses recherches ou observations médicales publiées dans la suite semblèrent bien, d'ailleurs, confirmer l'intervention attribuée au manganèse dans les phénomènes de la vie. Les plus importantes furent celles de Hannon, de Pétrequin et de Burin du Buisson.

Hannon, de Bruxelles, tout d'abord, avança que l'on pouvait tirer un parti avantageux des préparations manganésiennes dans les affections qui ont profondément débilité l'organisme. D'après lui, certains états chlorotiques seraient liés à un défaut de fer et de manganèse, d'autres à un défaut de fer seul ou de manganèse seul; l'administration judicieuse des deux métaux, associés ou séparés, selon les cas, donnerait alors d'excellents résultats.

Hannon ne s'est pas contenté d'essayer les effets physiologiques ou plutôt thérapeutiques du manganèse; il a, de plus, recherché ce métal dans le sang et, cela, en se plaçant, supposait-il, à l'abri des critiques adressées à Millon. Tous ses réactifs furent éprouvés d'avance; il ne se servit que de capsules en porcelaine ou en platine; ni le chlore, ni le verre, qui auraient pu apporter du manganèse, ne furent employés dans ses expériences. Voici comment il décrit son mode opératoire : « Je réduisis en cendre le caillot sanguin d'une personne qui n'avait pas été soumise au manganèse. Je traitai la cendre par l'acide nitrique pur, étendu d'eau distillée. Je neutralisai l'excès d'acide par du carbonate ammonique pur. Je fis passer dans la solution un courant de gaz sulfide hydrique, et je laissai

(1) *Ann. Chim. Physiq.*, 3e série, t. XXIII, p. 358 (1848). Il n'est pas sans intérêt de noter ici, d'une part, que Deschamps a signalé la présence du cuivre dans le sang, d'autre part, que Malaguti, Durocher et Sarzeaud, analysant les cendres du sang de bœuf, y ont trouvé à la fois du cuivre, du plomb et de l'argent. *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. XXIX, p. 780 (1850) et *Ann. Chim. Physiq.*, 3e série, t. XXVIII, p. 129 (1850).

reposer la liqueur pendant vingt-quatre heures; il ne se déposa ni sulfure de cuivre, ni sulfure de plomb. Je versai goutte à goutte dans le liquide une solution de succinate ammonique et je laissai déposer tout le fer. Je filtrai la liqueur et l'évaporai à siccité. C'est dans le résidu que se trouve le manganèse.

Pour contrôler ce résultat, je traitai d'une manière différente le sang d'une autre personne.

Je mêlai le sang défibriné par le battage avec deux fois son volume d'une dissolution de sulfate de soude concentrée; le liquide jeté sur un filtre passa incolore et laissa les globules sur le filtre. Je les lavai par une solution de sulfate de soude jusqu'à ce que tout le sérum les eût abandonnés.

Pour séparer enfin le sel sodique des globules, je chauffai le filtre à une température de 100 degrés; ils se coagulèrent et devinrent insolubles. Je traitai alors le filtre par de l'eau bouillante, le sulfate de soude fut entraîné et les globules restèrent purs.

Pour connaître les métaux fixés dans les globules, je les incinérai dans une capsule en platine, et je traitai la cendre comme je l'ai dit précédemment.

Cette fois encore je trouvai le manganèse dans le liquide sanguin.

J'analysai depuis le sang de bien d'autres personnes et constamment j'y découvris la présence de ce métal. J'eus occasion, tout en continuant ces remarques, de constater ce fait : c'est que la quantité de manganèse varie parfois considérablement dans les différentes affections.

Je le trouvai en grandes quantités dans le sang d'un homme pléthorique, d'un typhisé et d'un jeune homme atteint de syphilis constitutionnelle.

Chez un scrofuleux j'en trouvai moins, moins encore chez un tuberculeux, chez un anémique et chez plusieurs chlorotiques.

Pour s'assurer de ces résultats, il n'est point nécessaire de faire l'analyse quantitative du sang; la différence de nuance dans la coloration du verre de borax par la totalité du résidu de l'analyse suffit pour constater les faits avancés plus haut. En effet, en employant toujours la même quantité de cendre

et de borax, plus ce dernier se colorera de violet foncé sous l'action de la flamme extérieure du chalumeau, plus le manganèse se retrouvera en abondance dans le sang (1).

Les idées émises par Hannon ont été adoptées peu après, en France, par Pétrequin. Toutefois, en les appliquant, ce dernier ordonnait toujours le mélange de fer et de manganèse, afin d'atteindre son but thérapeutique sans avoir à faire de diagnostic différentiel des chloroses ferriques et manganiques (2).

A la demande de Pétrequin, Burin du Buisson reprit les analyses de Millon et de Hannon et, comme ceux-ci, il trouva « du manganèse en quantité notable dans le caillot du sang humain ». Ayant, en outre, dosé les globules, le fer et le manganèse sanguins dans trois états de santé différents, il obtint :

	POIDS, EN GRAMMES		
	des globules.	de l'oxyde ferrique.	de l'oxyde manganique.
Homme pléthorique . . .	143,500	1,360	0,071
Sang normal	128,200	1,220	0,060
Femme chlorotique . . .	63,980	0,500	0,025

chiffres d'après lesquels, fait observer Pétrequin, on voit qu'il y a, dans les affections qui modifient la composition du sang, des variations proportionnelles du manganèse, du fer et des globules et qu'il y aurait erreur à prétendre que tantôt le fer, tantôt le manganèse fait défaut dans le globule sanguin et que ce dernier peut être surchargé ou dépouillé de l'un ou de l'autre de ces deux métaux (3).

La question du manganèse dans le sang pouvait, à la suite de ces recherches, passer pour résolue, au moins dans ses

(1) *Etudes sur le manganèse*, Bruxelles (1849). On trouvera de cette brochure une analyse assez longue, mais ne renfermant rien de la partie chimique que nous reproduisons ici, dans *Journ. Pharm. Chim.*, 3e série, t. XVI, p. 41 et 189 (1849).

(2) *Gazette médic. de Paris*, 3e série, t. IV, p. 733 (1849). Ce mémoire renferme une série d'observations relatives à des guérisons d'anémies d'origines diverses par le manganèse. On en trouvera un extrait dans *J. Pharm. Chim.*, 3e série, t. XVI, p. 381 (1849).

(3) *Bull. gén. de Thérapeut.*, t. XLII, p. 193 (1852) et *Gazette médic. de Lyon*, t. VI, p. 265 (1854). Le premier de ces mémoires est extrait dans *J. Pharm. Chim.*, 3e série, t. XXI, p. 469 (1852) et le second reproduit dans le même Journal, t. XXVI, p. 420 (1854).

grandes lignes. Une publication de Glénard (1) vint cependant jeter sur elle une nouvelle suspicion et obliger à en reprendre l'étude. Glénard opérait sur le sang humain normal. Après l'avoir desséché et incinéré dans une capsule de platine, il éliminait la partie des cendres soluble dans l'eau, traitait le résidu par l'eau régale, chassait l'excès d'acides par évaporation et reprenait les chlorures obtenus par l'eau distillée. Dans la solution, additionnée de chlorhydrate d'ammoniaque et presque neutralisée par l'ammoniaque, il ajoutait alors du succinate d'ammoniaque bien neutre, chauffait le tout modérément et l'abandonnait au repos. Après quelques heures, le succinate de fer s'était déposé entièrement; la liqueur surnageante incolore était filtrée, évaporée à sec et le résidu, fortement chauffé pour chasser les sels ammoniacaux, était remis en dissolution à l'aide de l'eau régale. « Fondu avec la potasse caustique, il ne l'a pas colorée en vert. Chauffé au chalumeau avec le sel de phosphore et le borax, il n'a pas donné de perle de couleur améthyste. » Ainsi, il ne renfermait pas de manganèse. Le même résultat négatif fut obtenu dans deux expériences à partir d'un litre et demi de sang.

Glénard ne trouva pas davantage de manganèse en détruisant la matière organique d'abord par l'eau régale; il n'en trouva même pas en opérant sur 336 grammes de sang extrait de la veine d'un ouvrier des mines de manganèse de Romanèche.

Enfin, ayant appliqué la méthode de Millon à quatre échantillons de 100 grammes de sang, il réussit à constater dans l'un d'eux des traces non dosables de manganèse, mais les trois autres n'en contenaient pas.

De sorte que Glénard conclut que le manganèse n'est pas un élément essentiel du sang humain et que, s'il peut s'y trouver accidentellement, c'est en quantité très faible, inférieure à celle qui a été indiquée.

Burin du Buisson allégua contre les résultats et les conclusions de Glénard le témoignage de plusieurs médecins qui avaient obtenu des guérisons par l'emploi des sels de manganèse et le travail de de Kramer, qui avait, « quoique à petites

(1) *Journ. Pharm. Chim.*, 3e série, t. XXVI, p. 184 (1854).

doses, toujours pu trouver le manganèse dans le sang d'un grand nombre d'individus, et en conclut que le sang normal contient constamment ce métal en petite quantité » (1). Mais il n'apporta pas lui-même de fait nouveau et surtout ne fournit aucune explication sur la méthode dont il s'était servi pour doser le manganèse dans ses expériences (2).

Bonnewyn publia peu après, sans détail opératoire, le résultat de quelques expériences effectuées en vue de déceler le manganèse dans le sang de trois personnes, dont une femme traitée pendant deux mois avec des pilules au sulfate de manganèse; ce résultat fut entièrement négatif (3). Dès lors, soit à cause des contradictions nombreuses par lesquelles elle était passée, soit pour toute autre cause, la question du manganèse sanguin tomba pendant une assez longue période dans l'oubli.

Pollacci la reprit en 1870. « J'ai, dit-il, analysé plusieurs variétés de sang humain, différentes entre elles par le sexe, par l'âge, par le tempérament, par la santé des individus, et j'ai trouvé constamment dans tous ces échantillons une certaine quantité de manganèse; aussi, je puis, en pleine connaissance de cause, assurer que le manganèse est un des éléments essentiels du sang (4). »

Pollacci épuisait par l'eau les cendres du sang, préparées dans un creuset de platine, de manière à enlever les chlorures. Il traitait le résidu par une petite dose d'acide nitrique pur, introduisait le liquide dans un tube à essai, évaporait à siccité, puis calcinait en chauffant le tube au rouge. Enfin, après refroidissement, il versait dans le tube un peu d'acide nitrique étendu, faisait bouillir avec une petite quantité de bioxyde de

(1) *Institut Lombard*, t. I, Milan (1852).

(2) Dans son travail contradictoire, Glénard rapporte que Burin du Buisson « a fait paraître à Lyon, en 1853, dans la *Gazette médicale*, un mémoire intitulé : *Sur l'existence du manganèse dans le sang* », et il ajoute : « Par ce travail, le plus complet, le plus détaillé, l'auteur apporte de nouvelles preuves à l'appui des faits allégués par ses devanciers, les précise plus nettement et y ajoute des observations nouvelles... » Nous n'avons pu trouver aucune publication de ce genre dans la *Gazette médicale de Lyon*, de 1851 à 1854. Dans le volume paru en 1853, il y a bien un mémoire de Burin du Buisson, mais il n'y est pas question du manganèse. Il est probable que l'indication donnée par Glénard est inexacte, car Burin du Buisson n'y fait lui-même aucune allusion.

(3) *J. Pharm. Chim.*, 3e série, t. XXVII, p. 284 (1855).

(4) *Ibid.*, 4e série, t. II, p. 375 (1870).

plomb. Par le repos, il obtenait un liquide de couleur pourpre, plus ou moins intense, couleur due à l'acide permanganique. Le poids de 300 grammes de sang frais donnait la réaction du manganèse d'une manière assez marquée, pouvant être rendue plus évidente en portant la quantité de sang à 400 ou 500 grammes.

Huit ans plus tard, Riche fit paraître à son tour un mémoire détaillé sur le manganèse du sang (1). Dans ce mémoire, le plus complet qui ait été publié sur la question, Riche expose d'abord une nouvelle méthode de recherche et de dosage de petites quantités de manganèse, basée sur l'électrolyse, puis il applique cette méthode à l'étude du sang de l'homme et de quelques animaux, bœuf, mouton, porc et cheval.

On connaît le principe de sa méthode : lorsqu'on fait passer un courant électrique dans une solution faiblement acidulée de nitrate ou mieux de sulfate de manganèse, on voit apparaître la coloration rose de l'acide permanganique, puis le manganèse se dépose soit sur l'électrode positive, soit en flocons dans la liqueur, à l'état de bioxyde. Le précipité, lavé et calciné, en même temps que l'électrode de platine, se transforme en oxyde salin dont le poids permet de calculer celui du métal cherché.

A la condition d'opérer en l'absence de fer, Riche a reconnu, dans des expériences synthétiques, la possibilité de retrouver de petites quantités de manganèse à 1/2 milligramme près, limite de sensibilité de sa balance.

Pour appliquer la méthode au sang, Riche détruisait les matières organiques par calcination dans une capsule de platine, à la température la moins haute possible. Le résidu débarrassé des parties solubles dans l'eau bouillante était repris par l'acide chlorhydrique étendu. La liqueur était évaporée à sec et maintenue une demi-heure à une température suffisante pour insolubiliser la silice et pour décomposer une faible quantité de chlorure de platine provenant de l'attaque de la capsule pendant l'incinération. La masse était reprise par l'eau faiblement acidulée par l'acide chlorhydrique, la dissolution filtrée, puis mise en digestion pendant vingt-

(1) *Ibid.*, 4e série, t. XXVII, p. 538 (1878).

quatre heures avec du carbonate de baryum précipité. La liqueur filtrée était saturée par un léger excès d'acide sulfurique, évaporée à sec après filtration. Enfin, le résidu était repris par XV à XX gouttes d'acide sulfurique concentré que l'on promenait dans la capsule et que l'on maintenait pendant un quart d'heure vers le point où l'acide sulfurique commence à répandre des fumées. Le produit à peu près sec était repris par l'eau que l'on entretenait vers + 100 degrés pendant quelque temps, et la liqueur jetée sur un très petit filtre était recueillie dans le creuset de platine pour être soumise au courant. Afin d'avoir une acidité convenable, la solution était saturée par quelques gouttes de potasse pure et la liqueur neutre sursaturée par II à III gouttes d'acide sulfurique.

Riche a trouvé :

ORIGINE DU SANG	POIDS DE SANG analysé.	POIDS DE Mn^3O^4 par kilogr.
—	—	—
Bœuf	500 gr.	0 gr. 0015
—	750 gr.	0 gr. 0005
—	1.308 gr.	0 gr. 0003
Mouton	500 gr.	0 gr. 0025
—	750 gr.	0 gr. 0010
—	1.410 gr.	0 gr. 0005
Porc	1.235 gr.	0 gr. 0015
Cheval	1.375 gr.	0 gr. 0015
Femme	250 gr.	0 gr. 002
—	250 gr.	traces.

c'est-à-dire des proportions de manganèse très petites, ayant pu échapper à ceux de ses devanciers qui avaient conclu négativement, faute sans doute d'une méthode de recherche assez sensible, mais tellement au-dessous, d'autre part, de celles qui avaient été indiquées par Wurzer, Millon, Hannon, Burin du Buisson, etc., qu'il est nécessaire d'admettre, dans les expériences de ces derniers, des causes d'erreur importantes, comme l'introduction de manganèse par les réactifs ou l'emploi de procédés de dosage tout à fait défectueux.

Riche s'est assuré que le bioxyde de plomb, vendu pur à cette époque, par les divers fabricants, contenait du manganèse et donnait encore une coloration rose faible, même après plusieurs lavages à l'acide azotique. C'est le réactif qui avait été employé par Pollacci.

Aussi Riche termine-t-il son mémoire en écrivant que le manganèse n'existe pas dans le sang « par une loi physiologique, qu'il n'en est pas un des facteurs indispensables, mais un principe accidentel, étranger; qu'il ne concourt pas, comme le fer, à la production du globule sanguin, c'est-à-dire de l'élément organique principal; qu'il n'y a pas de chloroanémie produite par le manque de manganèse et même qu'il est loin d'être démontré, comme on l'affirme dans beaucoup d'ouvrages de médecine, que le manganèse puisse être employé avec succès en thérapeutique comme un succédané ou un adjuvant du fer. »

Cette manière de voir fut également partagée par Maumené, à la suite des recherches qu'il a publiées en 1884, sur l'existence du manganèse dans les animaux et les plantes et sur son rôle dans la vie animale (1). « Le sang, écrit-il, n'en renferme pas toujours, on le sait; nous avons examiné le sang d'une femme en couches; ni le caillot, ni le sérum de 100 grammes ne nous en ont donné trace... On doit considérer le manganèse comme un accident parmi nos éléments constitutifs; nous le rejetons nettement du liquide vital, etc.

« La médecine doit renoncer à l'emploi du manganèse comme succédané du fer... Le manganèse est un intrus dont le sang peut tolérer des traces, mais les rejette sans cesse, parce que le métal deviendrait nuisible s'il parvenait à s'y accumuler ou seulement à s'y maintenir. »

Tel était l'état de la question du manganèse du sang lorsque nous avons été conduit à nous en occuper. Une lecture attentive des travaux analysés ci-dessus, une connaissance particulière des méthodes de recherche et de dosage du manganèse acquise dans des études antérieures, enfin et surtout une série d'expériences de contrôle, nous ont fait supposer que cette question importante n'était pas résolue. Si l'on examine, par exemple, les travaux de Riche, c'est-à-dire ceux qui offrent le plus de garantie, on est frappé, à la lecture, par ce résultat singulier que la proportion de manganèse trouvée dans un même sang, bœuf ou mouton, est d'autant plus petite que le

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, t. XCVIII, p. 1416 (1884).

dosage porte sur une plus grande quantité de liquide. Il y a là au moins la présomption d'une erreur systématique, due sans doute à ce que les poids de sesquioxydes pesés sont très petits, d'un ordre de grandeur voisin de la limite de sensibilité de la balance utilisée pour ces dosages.

Riche s'est servi, comme on l'a vu, du carbonate de baryum pour séparer le manganèse et le fer. Cette méthode ne convient pas, d'après nos expériences, lorsqu'il s'agit de retrouver et de doser seulement de très petites quantités de manganèse en présence de quantités notables de fer : le premier métal est précipité en partie avec le second.

Nous avons fait nos expériences de contrôle avec le sulfate de manganèse et l'alun de fer ammoniacal utilisés par l'un de nous dans des recherches antérieures (1) et du carbonate de baryum que nous avons préparé bien exempt de carbonate alcalin en traitant une solution de baryte recristallisée par un courant de gaz carbonique. Le précipité a été lavé cinq fois à l'eau chaude, à l'aide de la centrifuge.

Cinq grammes d'alun de fer dans une première expérience, 10 dans une seconde, ont été dissous dans 100 cent. cubes d'eau, additionnés de 0 milligr. 050 de manganèse à l'état de sulfate et, peu à peu, de carbonate de baryum, en agitant souvent, jusqu'à ce que le liquide soit décoloré. On a laissé déposer. Après vingt-quatre heures, le liquide séparé par centrifugation et débarrassé de baryum par l'acide sulfurique pur ne contenait que 0 milligr. 015 de manganèse dans la première expérience et 0 milligr. 012 dans la seconde, le métal étant dosé à l'état d'acide permanganique, comme on le verra plus loin. Une expérience témoin, effectuée en même temps, avec 10 grammes d'alun de fer seul, n'a pas donné trace de manganèse.

Riche a fait une expérience de contrôle analogue à la nôtre, avec une plus grande quantité de manganèse, mais il l'a interprétée dans un sens contraire, bien qu'elle ait fourni, au fond, le même résultat. Ayant pris 0 gr. 200 de fer et une liqueur titrée correspondant à 0 milligr. 500 de manganèse, il a obtenu par la pile « une coloration rose très accusée » ; or, on peut lire, dans la description de sa méthode, qu'une solution de

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et 515 (1912).

0 milligr. 013 de Mn^3O^4 donne « une coloration rose très nette », qu'une solution en renfermant 0 milligr. 200 fournit un dépôt de bioxyde « non douteux », et, enfin, qu'avec 0 milligr. 500 le dépôt « est très net » (1). En supposant que le sel de fer employé par Riche n'ait pas contenu de manganèse, il y avait donc une perte notable du métal recherché.

Malgré ce défaut de la méthode, il faut supposer, pour expliquer les résultats obtenus par Riche avec le sang, que ses pertes en manganèse étaient compensées et au delà par quelque cause d'erreur de sens opposé.

Plusieurs des auteurs qui, avant Riche, avaient signalé la présence du manganèse dans le sang, s'étaient servi, pour précipiter le fer, du succinate d'ammonium. Nous avons reconnu que ce réactif ne saurait, guère mieux que le carbonate de baryum, être employé pour séparer des traces de manganèse dans un liquide contenant du fer.

Le succinate dont nous nous sommes servi a été préparé en saturant par l'ammoniaque pure, jusqu'à réaction presque neutre à l'hélianthine, une solution d'acide succinique purifié antérieurement (2).

Nous avons pris, dans une première expérience, 5 grammes d'alun de fer et 0 milligr. 050 de manganèse; la précipitation a été faite avec trois grammes d'acide succinique à l'état de sel ammoniacal. Nous avons retrouvé seulement dans le liquide séparé par centrifugation, évaporé à sec et calciné, 0 milligr. 025 de Mn. Une seconde expérience, avec un poids double d'alun de fer et aussi, par conséquent, d'acide succinique, nous a permis de retrouver également 0 milligr. 025 de manganèse. Enfin, dans une expérience témoin, avec 10 grammes d'alun de fer et 7 grammes de réactif précipitant, sans addition de manganèse, nous n'avons pas eu, comme il fallait s'y attendre, trace de ce dernier métal.

(1) Nous avons soumis à une série de vérifications la méthode électrolytique de Riche, en nous plaçant au point de vue de la recherche et du dosage de très petites quantités de manganèse. Nous avons fait varier la nature du courant, opéré en présence d'acide sulfurique, seul ou additionné de sulfate alcalin, de traces de platine, etc. Nous n'avons jamais pu atteindre la limite de sensibilité indiquée par l'auteur. Les résultats décrits par Riche se vérifient très bien, au contraire, lorsqu'on utilise des solutions dix fois plus concentrées.

(2) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241 et 515 (1912).

Nous n'approfondirons pas les causes d'erreur qui ont pu intervenir dans les autres recherches : à l'apport de manganèse par le courant de chlore gazeux, déjà invoqué par Melsens contre les résultats de Millon; ou par le bioxyde de plomb préparé autrefois, comme l'a montré Riche, il suffit d'ajouter celui dû à la plupart des autres réactifs pour expliquer, au moins en partie, les teneurs en manganèse auxquelles sont arrivés certains expérimentateurs. D'autre part, Riche n'a probablement pas perdu beaucoup de métal ; or, il n'en a trouvé qu'une proportion inférieure à 2 milligrammes par litre. Il est possible, si cette proportion existe réellement, que Melsens, Glénard et ceux qui n'ont pas reconnu la présence du manganèse, ont employé des réactions trop peu sensibles. Mais il n'est pas même certain, en définitive, que la petite proportion de métal dosée par Riche dans le sang ne soit pas due à ce que les causes de gain aient dépassé les causes de perte. Il était donc nécessaire de reprendre la question à l'aide d'une méthode à l'abri des critiques énumérées plus haut. Voici la description de celle que nous avons suivie :

Le sang est recueilli, au sortir de la veine, soit directement dans une capsule de platine, soit dans un flacon spécialement nettoyé et renfermant, dans le cas où le sang n'est pas immédiatement soumis à l'analyse, une quantité d'oxalate d'ammonium pur en poudre correspondant à environ un millième du poids de liquide, pour éviter la coagulation.

L'échantillon de sang, pesé dans la capsule de platine de grande dimension, est évaporé à sec dans une étuve puis calciné au four à moufle, à la température la plus basse possible. A partir de ce moment, on suit exactement les indications qui ont été données par l'un de nous pour la recherche et le dosage de très petites quantités de manganèse dans les matières organiques (1) : sulfatation, reprises successives des cendres par les acides chlorhydriques et sulfurique, chauffage final pour chasser les dernières traces de gaz chlorhydrique et décomposer les sels de platine.

On dissout le résidu dans l'acide nitrique étendu de trois fois son volume d'eau, en chauffant un peu, et l'on décante dans un

(1) GABRIEL BERTRAND, *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. IX, p. 361 (1911).

tube jaugé. On ajoute un gramme de phosphate monopotassique (1), trois ou quatre gouttes de nitrate d'argent au dixième et l'on complète le volume marqué par le trait de jauge. On se place dans de bonnes conditions de concentration en opérant sur environ 100 grammes de sang et en amenant la solution acide des cendres à 10 cent. cubes. Si l'on opère à une concentration notablement plus élevée, par exemple quatre à cinq fois et davantage, la richesse saline gène la transformation du manganèse en acide permanganique (2) et le dosage devient inexact. Il peut même arriver, avec une concentration finale très forte, que le manganèse passe inaperçu s'il est en minime proportion. La dilution avec un ou deux volumes d'acide nitrique au quart permet, dans ce cas, de faire réapparaître la réaction du manganèse.

S'il arrivait, pour une cause ou pour une autre, dont la principale est la présence de platine, que la solution acide des cendres ne soit pas limpide, il ne faudrait pas filtrer, mais simplement laisser déposer jusqu'au lendemain, puis décanter dans un autre tube, où l'on effectuerait le dosage sans avoir à changer le volume de la solution décantée.

A cause du fer et malgré la présence du phosphate acide de potassium, la solution des cendres du sang n'est pas tout à fait incolore, mais faiblement teintée de jaune. Au lieu de la chauffer lentement après addition de persulfate de potassium, il nous a semblé préférable de la porter d'abord à l'ébullition, puis d'y faire tomber le réactif oxydant : l'acide permanganique se forme alors d'une manière très rapide et le virage, jamais très intense dans le cas du sang, devient plus facile à saisir.

Enfin, la coloration jaune du fer, surtout sensible à chaud, masquant en partie le rose permanganique, il est indispensable, pour obtenir des dosages colorimétriques aussi exacts que possible, d'opérer les comparaisons avec des liqueurs titrées de sulfate de manganèse additionnées d'une proportion convenable d'alun, de fer et de phosphate de potassium.

Nous avons pris les précautions les plus minutieuses, au

(1) Gabriel Bertrand, *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. 11, note page 496.

(2) Il en est de même, comme nous l'avons reconnu, lorsqu'on se sert de la méthode d'oxydation électrolytique.

cours de nos recherches, pour éviter les contaminations par des substances manganésifères : le matériel a été lavé autant de fois qu'il a fallu à l'acide chlorhydrique concentré et chaud; nous avons fait attention à ce que des poussières, comme celles de rouille, provenant des fourneaux, ne puissent tomber dans les capsules; enfin, tous les réactifs ont été purifiés au point de ne donner aucune trace de réaction du manganèse, même en opérant sur des quantités 10 à 50 fois plus grandes que celles mises en usage dans une seule expérience.

Les expériences de contrôle suivantes donneront une idée de la valeur de la méthode employée.

Nous avons d'abord incinéré 25 grammes de saccharose pur en présence de 0 gr. 500 de chlorure de sodium pur et d'une très petite quantité de sulfate de manganèse. Nous avons pu retrouver dans les cendres exactement la première fois les 0 milligr. 100 et la seconde fois les 0 milligr. 010 de manganèse que nous avions introduits.

En nous servant de sang de bœuf, dans lequel, on le verra plus loin, on ne trouve pas de manganèse lorsqu'on opère dans les conditions où nous nous sommes placés, 100 grammes de sang seul ont fourni des cendres dont la solution acide, faiblement teintée de jaune, ne virait pas par le persulfate de potassium, tandis qu'après addition de 0 milligr. 050 de manganèse à l'état de sulfate, avant l'incinération, le virage correspondait à 0 milligr. 047 de métal introduit.

Voici maintenant, rassemblés en un tableau, les résultats que nous avons obtenus (voir page suivante).

Lorsque nous n'avons pas trouvé de manganèse, nous nous sommes assurés que cela n'était pas dû à quelque circonstance empêchante, en ajoutant 0 milligr. 005 de manganèse à l'essai et en recommençant l'oxydation par le persulfate : il y a toujours eu alors formation d'une quantité appréciable d' acide permanganique et virage net de la liqueur.

Nous pensons que s'il y avait eu 0 milligr. 003 de manganèse dans l'échantillon de sang analysé nous aurions déjà eu une réaction positive ; c'est pourquoi, dans le tableau, les résultats négatifs sont exprimés par une limite.

ORIGINE du sang.	POIDS du sang analysé.	POIDS DE MANGANÈSE, EN MILLIGRAMME, TROUVÉ dans l'échantillon.	dans un litre de sang.
Homme	50 gr.	0,000 c.-à-d. < 0,002	0,00 c.-à-d. < 0,02
(mélange de	73 gr.	Id.	Id.
plusieurs sangs.)	100 gr.	0,002	0,02
Mouton.	100 gr.	0,006	0,06
Cheval.	80 gr.	0,002	0,02
—	100 gr.	0,002	0,02
Bœuf.	100 gr.	0,000 c.-à-d. < 0,002	0,00 c.-à-d. < 0,02
—	100 gr.	Id.	Id.
Porc.	100 gr.	0,002	0,02
—	100 gr.	0,000 c.-à-d. < 0,002	0,00 c. à-d. < 0,02
Lapin.	40 gr.	Id.	Id.
—	63 gr.	Id.	Id.
—	89 gr.	Id.	Id.
—	100 gr.	Id.	Id.
Phoque.	50 gr.	Id.	Id.
Poule.	30 gr.	Id.	Id.
Canard.	63 gr.	Id.	Id.

Nous avons cherché, dans le cas du sang de mouton, quelle partie, globules ou plasma, pouvait renfermer la plus grande proportion de manganèse. Dans une expérience préliminaire, nous avons opéré simplement sur le liquide et le dépôt obtenus par une puissante centrifugation; dans une seconde expérience, nous avons, en outre, lavé les globules à quatre reprises différentes avec une solution de chlorure de sodium pur à 9 grammes par litre, en centrifugeant chaque fois. Nous avons trouvé :

	POIDS de substance analysée.	POIDS de Mn trouvé.	MANGANÈSE par kilogramme.
Plasma (exp. 1)	100 gr.	0 mgr. 006	0 mgr. 06
— (exp. 2)	80 gr.	0 mgr. 004	0 mgr. 05
Globules (exp. 1)	100 gr.	0 mgr. 002	0 mgr. 02
— (exp. 2)	80 gr.	0 mgr. 002	0 mgr. 025

Comme dans la seconde de ces expériences, le lavage avait été poussé assez loin pour que les globules renfermassent moins d'un centième de leur poids de plasma, il est certain qu'il y a du manganèse aussi bien dans les éléments cellulaires que dans la partie liquide du sang, mais en proportion deux à trois fois plus petite. Il n'est pas probable que le manganèse des globules entre dans la constitution de leur matière colorante,

car nous n'avons pas trouvé trace du métal dans un gramme d'hémoglobine de sang de cheval purifiée par quatre cristallisations successives et, cela, dans des conditions expérimentales où 0 milligr. 001 de manganèse aurait été facilement reconnu.

On voit, en résumé, que si le manganèse existe dans le sang de l'homme et des animaux supérieurs, c'est en proportions beaucoup plus petites que certaines recherches avaient pu jusqu'ici le faire supposer. Nous estimons que, dans nos expériences, une quantité absolue de 2 à 3 millièmes de milligramme ne nous aurait pas échappée et, d'autre part, que les chiffres des dosages ont dû être exacts à cette quantité près. Dans les neuf espèces de sang que nous avons examinées, appartenant à l'homme ou à des animaux supérieurs, il n'y a donc qu'une proportion de manganèse inférieure à un dixième et même généralement à un vingtième de milligramme par litre, répandue surtout dans la partie liquide ou plasma.

Il reste à savoir si ce manganèse est un élément passif et inutile ou, au contraire, un élément indispensable au fonctionnement de l'organisme; c'est ce que nous nous proposons maintenant de rechercher.

SECONDE NOTE
SUR LA CONSERVATION DES « TOXINES SOLUBLES »

par M. NICOLLE ET CH. TRUCHE.

Nous avons montré (1) l'avantage que présentaient, au point de vue de la conservation des toxines, les « solutions » glycérinées préparées avec un excès de poison sec, notamment en ce qui concerne la tétanine et la ricine.

Un titrage récent de la solution de *tétanine*, dite *solution-mère* dans notre première note, et de notre solution de *ricine* nous a fourni des chiffres instructifs que nous mentionnons ci-dessous (*en lettres grasses*), à la suite des chiffres déjà publiés (pour la ricine, les derniers titrages n'ont été faits que sur les cobayes et les souris — il a paru inutile d'injecter des lapins).

TOXINE TÉTANIQUE

Solution-mère (titrée, pour la première fois, après deux mois).

Injections intramusculaires.

	ACTION SUR LES COBAYES				ACTION SUR LES SOURIS		
	I g.	II g.	III g.	IV g.	I g.	II g.	III g.
Après 2 mois.	+ en 3 j.	+ en 2 j.					
Après 10 mois.	+ en 3 j.	+ en 2 j. 1/2.			+ en 1 j. 1/2.		
Après 20 mois.	+ en 3 j. 1/2.		+ en 2 j. 1/2.		+ en 2 j.		
Après 3 ans + 7 mois.	T. local	+ en 6 j.	+ en 3 j. 1/2,				
Après 5 ans.	T. local	+ en 9 j.	+ en 4 j. 1/2.	+ en 4 j.	+ en 4 j. 1/2.	+ en 2 j. 1/2.	+ en 2 j.
Après 7 ans + 3 mois.	**T. local**	**T. local**	**+ en 8 j. 1/2.**	**+ en 5 j. 1/2.**	**T. local.**	**+ en 3 j.**	**+ en 2 j. 1/2.**

(1) Ces *Annales*, décembre 1910.

RICINE

Solution titrée, pour la première fois, après deux mois (lapins) et après dix-neuf mois (cobayes et souris).

Injections sous-cutanées.

	1 goutte		10^{-1} goutte		10^{-2} goutte	
	Cobayes.	Souris.	Cobayes.	Souris.	Cobayes.	Souris.
Après 19 mois	+ en 20 h.	+ en 12 h.	+ en 3 j.	+ en 12 h.	Eschare.	+ en 1 j. 1/2.
Après 21 mois	+ en 18 h.					
Après 26 mois	+ en 1 j. 1/2.	+ en 3 j.	+ en 3 j.	+ en 20 h.	Eschare.	+ en 2 j.
Après 4 ans	**+ en 1 j. 1/2.**	**+ en 15 h.**	**+ en 3 j.**	**+ en 20 h.**	**Eschare.**	**+ en 1 j. 1/2.**

Les chiffres qui précèdent (moyennes de plusieurs expériences) prouvent qu'après sept ans et trois mois l'activité de la *tétanine* n'est pas encore près de disparaître, malgré une baisse continue — et qu'après quatre ans la *ricine* n'a subi aucun fléchissement appréciable de son pouvoir toxique.

ACTION INHIBITRICE DE L'ACIDE CARBONIQUE SUR L'HÉMOLYSE ET LA BACTÉRIOLYSE

par le D[r] SAWTSCHENKO.

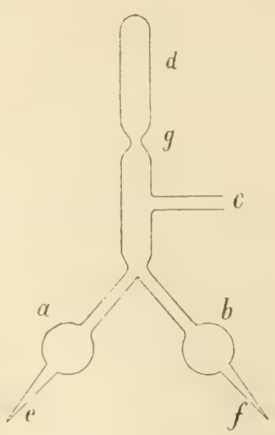
(Travail de l'Institut Pasteur de Bruxelles.)

On peut constater aisément que le gaz carbonique protège les globules rouges contre l'influence destructive du sérum hémolytique. A quoi doit-il ce pouvoir ? Pour résoudre cette question, on réalise les expériences suivantes :

On construit tout d'abord un appareil en verre très simple figuré ci-contre : en aspirant soit en *c*, soit en *f*, on introduit dans la boule *a* un mélange de 0,3 cent. cube de solution physiologique de NaCl et de 0,3 cent. cube de sang de chèvre défibriné, préalablement lavé, et dans la boule *b*, un mélange de 0,3 cent. cube d'alexine (sérum frais de cobaye) et de 0,6 cent. cube de sérum hémolytique (préalablement chauffé à 56 degrés) de lapin immunisé contre les globules rouges de chèvre. On a eu soin, avant d'introduire ces mélanges dans l'appareil, d'y faire barboter du CO^2.

On ferme alors à la lampe les extrémités effilées *e* et *f*, on raccorde *c* à la trompe, on fait le vide, on laisse ensuite rentrer de l'acide carbonique. Pour faciliter l'élimination de l'oxygène dissout, on a eu soin de placer les boules *a* et *b* dans un bain d'eau à 37 degrés. On fait le vide de nouveau, on introduit encore CO^2, et ainsi de suite trois ou quatre fois. Le sang prend une teinte foncée. Le tube *c* est alors fermé à la lampe. On retourne l'appareil de sorte qu'on réunit les deux liquides dans le tube *d*. On chauffe alors l'étranglement *g*, de manière à le fermer en détachant le tube *d* de l'appareil. Le mélange renfermé dans le tube *d* hermétiquement clos, est donc préservé de tout contact avec l'atmosphère. Aucune hémolyse ne s'y effectue, même à la température de l'étuve, tandis qu'un mélange de composition identique, mais exposé à l'air, s'hémolyse rapidement. Si l'on

vient à ouvrir le tube *d* en l'agitant quelque peu de manière à favoriser le départ de l'acide carbonique et la pénétration de l'air dans le liquide, l'hémolyse s'observe. Le gaz carbonique ne détruit donc pas les substances participant à l'hémolyse, mais se borne à suspendre leur action. On peut démontrer ce fait d'une façon plus frappante encore : si, immédiatement après avoir ouvert le tube *d*, on fait pénétrer dans un tube capillaire un peu du liquide qu'il contient, on constate au bout de quelque temps que l'hémolyse apparaît exclusivement au voisinage des deux extrémités ouvertes de ce tube capillaire, c'est-à-dire au contact de l'atmosphère.



Répétons maintenant, en nous servant de l'appareil ci-dessus décrit, la première expérience, qui nous permet d'obtenir dans un tube *d* fermé, un mélange de globules, de sensibilisatrice et d'alexine, où l'hémolyse n'apparaît pas. Centrifugeons cette fois le tube *d* avant de l'ouvrir. Les globules s'étant déposés, ouvrons le tube et décantons rapidement le liquide surnageant. Versons sur le sédiment de globules un peu de solution physiologique et agitons pour éliminer entièrement CO^2. L'hémolyse ne s'opère pas. Les globules sont pourtant bien sensibilisés, car ils s'hémolysent aisément si on les additionne d'un peu d'alexine (sérum normal frais).

Tout se passe donc comme si le gaz carbonique s'était opposé à la fixation d'alexine. S'il en est ainsi, nous devons retrouver celle-ci dans le liquide surnageant, que nous avons retiré du tube *d* après la centrifugation. Chose curieuse, ce liquide se montre incapable d'hémolyser des globules rouges sensibilisés.

Nous savons pourtant que ce liquide est capable de détruire, sinon des globules sensibilisés, en tous cas les globules que le tube *d* contenait, car si l'on n'avait pas eu recours à la centrifugation, si l'on s'était borné à ouvrir le tube *d* et à agiter pour permettre le remplacement de l'acide carbonique par de l'air, le mélange aurait manifesté l'hémolyse. Il est donc certain que

les globules du tube *d* ont fixé autre chose que la sensibilisatrice. S'ils n'ont pas absorbé l'alexine totale, au moins ont-ils dû s'emparer de l'un de ses constituants.

On démontre aisément qu'il en est bien ainsi.

En réalité, les globules mélangés, à l'abri de l'air et en présence d'acide carbonique, au sérum hémolytique, absorbent non seulement la sensibilisatrice, mais aussi le « mittelstück », c'est-à-dire le fragment central de l'alexine. Quant au fragment terminal (endstück), il se maintient à l'état libre dans le liquide.

Il est facile, grâce aux recherches inaugurées par Ferrata et Brand, d'obtenir à l'état isolé les deux constituants de l'alexine. On peut avoir recours à la technique de Liefmann, qui consiste à allonger ce sérum normal frais de neuf volumes d'eau distillée et à y faire barboter du gaz carbonique. Le précipité de globulines centrifugé et lavé contient le « mittelstück » que l'on redissout dans de la solution physiologique ; le liquide surnageant renferme l'endstück.

Or, on constate que pour provoquer l'hémolyse des globules provenant du tube *d*, il suffit de les additionner d'enstück, ce qui démontre qu'ils avaient déjà fixé du mittelstück. D'autre part, le liquide surnageant décanté de ce même tube *b* après la centrifugation, et qui, nous l'avons vu, se montre incapable de détruire des globules sensibilisés, récupère son énergie hémolytique, vis-à-vis de semblables globules, si on l'additionne de mittelstück; l'addition d'endstück est inopérante.

En résumé, les globules sensibilisés qui baignent à l'abri de l'air dans un liquide saturé d'acide carbonique, s'emparent du mittelstück, mais l'absorption de l'endstück est inhibée.

Nous retrouvons les mêmes phénomènes à propos de la bactériolyse.

On opère sur le vibrion cholérique. On introduit dans l'une des boules de l'appareil un mélange de 2,7 cent. cubes d'émulsion de vibrions et de 0,3 cent. cube de sérum anticholérique (préalablement chauffé à 56 degrés), et dans la seconde boule, un mélange de 1,4 cent. cube d'alexine avec 0,6 cent. cube de solution physiologique. Après extraction de l'air et introduction de CO^2, les deux mélanges sont réunis dans le tube *d*. La bac-

tériolyse ne s'y produit pas, même au bout d'une heure à 37 degrés, tandis qu'elle s'opère aisément dans un mélange identique exposé à l'air.

BIBLIOGRAPHIE

BRAND, *Berl. klin. Wochen.*, n° 34, 1907.
FERRATA, *ibid*, n° 13.
LIEFMANN, *Münch. klin. Wochen.*, n° 41, 1909.
GENGOU, *Zeitsch. f. Immünitats forsch.*, 1911, IX, XI.

ERRATA

Mémoire de M. Gabriel BERTRAND : « Les infiniment petits chimiques en agriculture ».

Page 853, ligne 19 : au lieu de : « *et que l'homme et les animaux...* », lire : « *ou que l'homme et les animaux* ».

Page 861, lignes 18 à 21 : au lieu de : « *Il faut qu'ils entrent dans les cycles de transformations mis en jeu par la culture pour l'organisation des éléments plastiques et en sortent alternativement.* », lire : « *Il faut qu'ils entrent pour en ressortir bientôt et se trouver, de la sorte, encore prêts à servir, dans les cycles de transformations utilisés par la cellule, pour organiser les éléments plastiques.* »

TABLE DES MATIÈRES



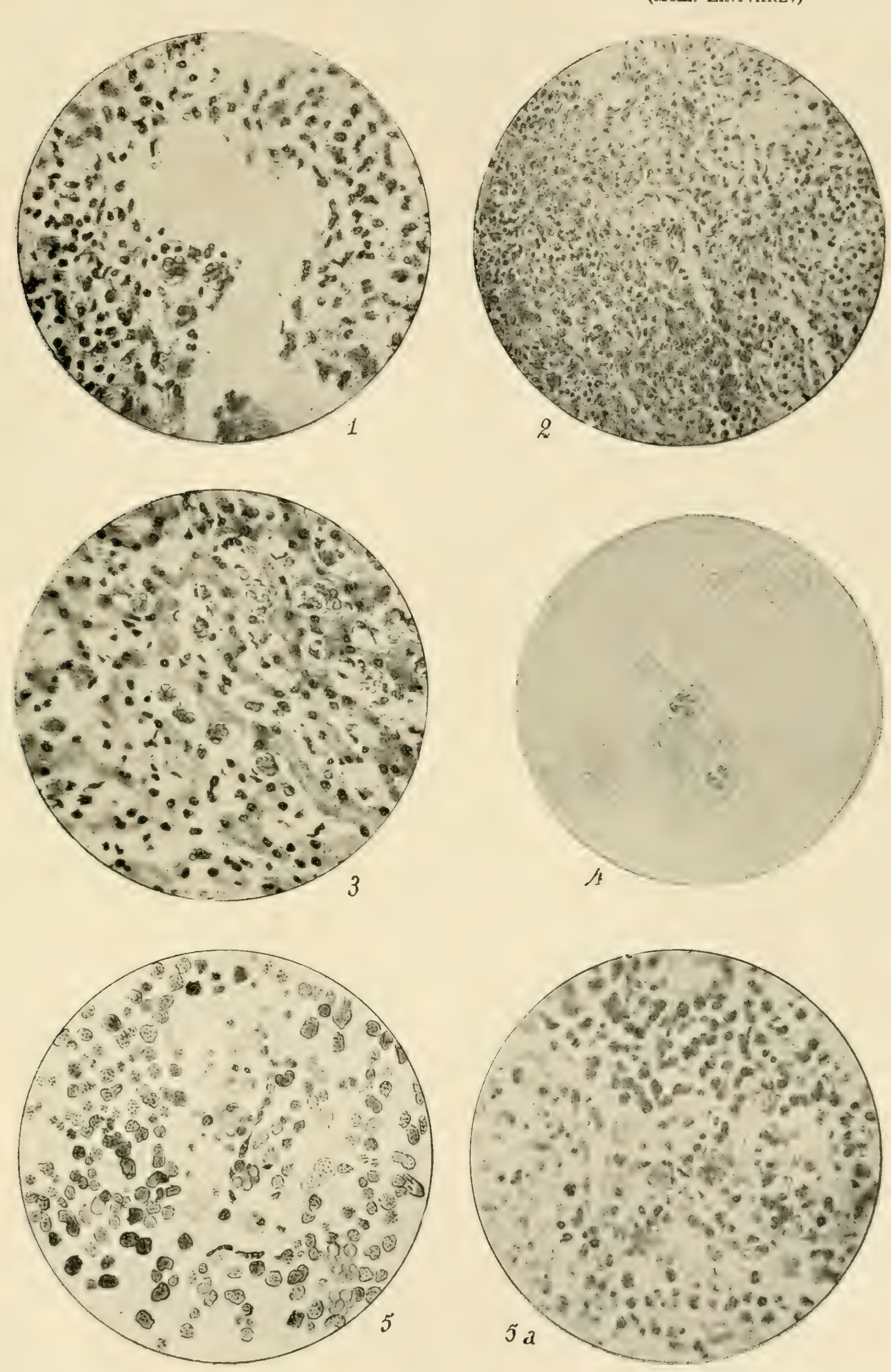
TABLE DES PLANCHES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

Le Gérant : G. Masson.

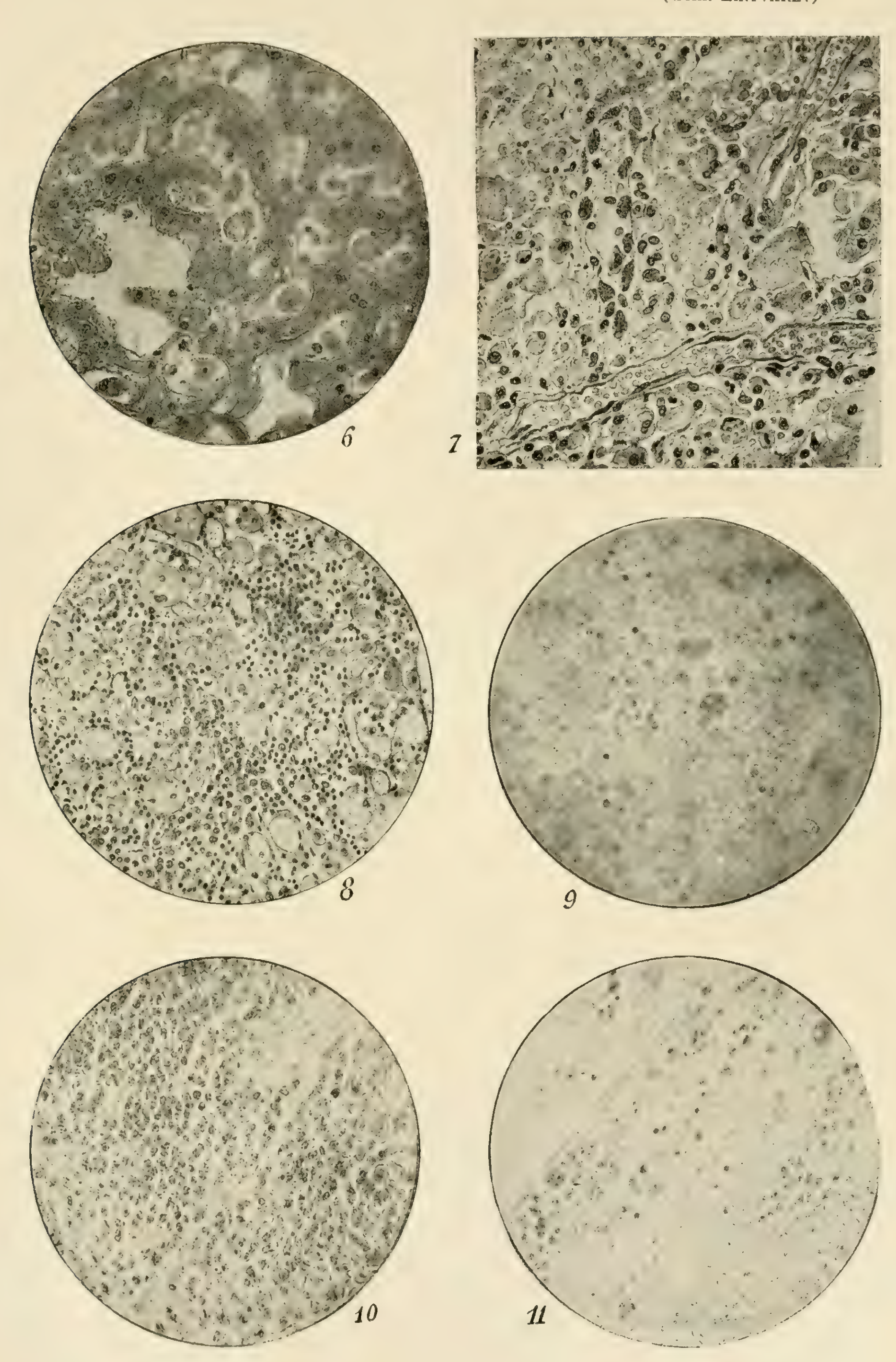
Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.

Vol. XXVI. – Pl. I.
(Mém. LINTVAREV)

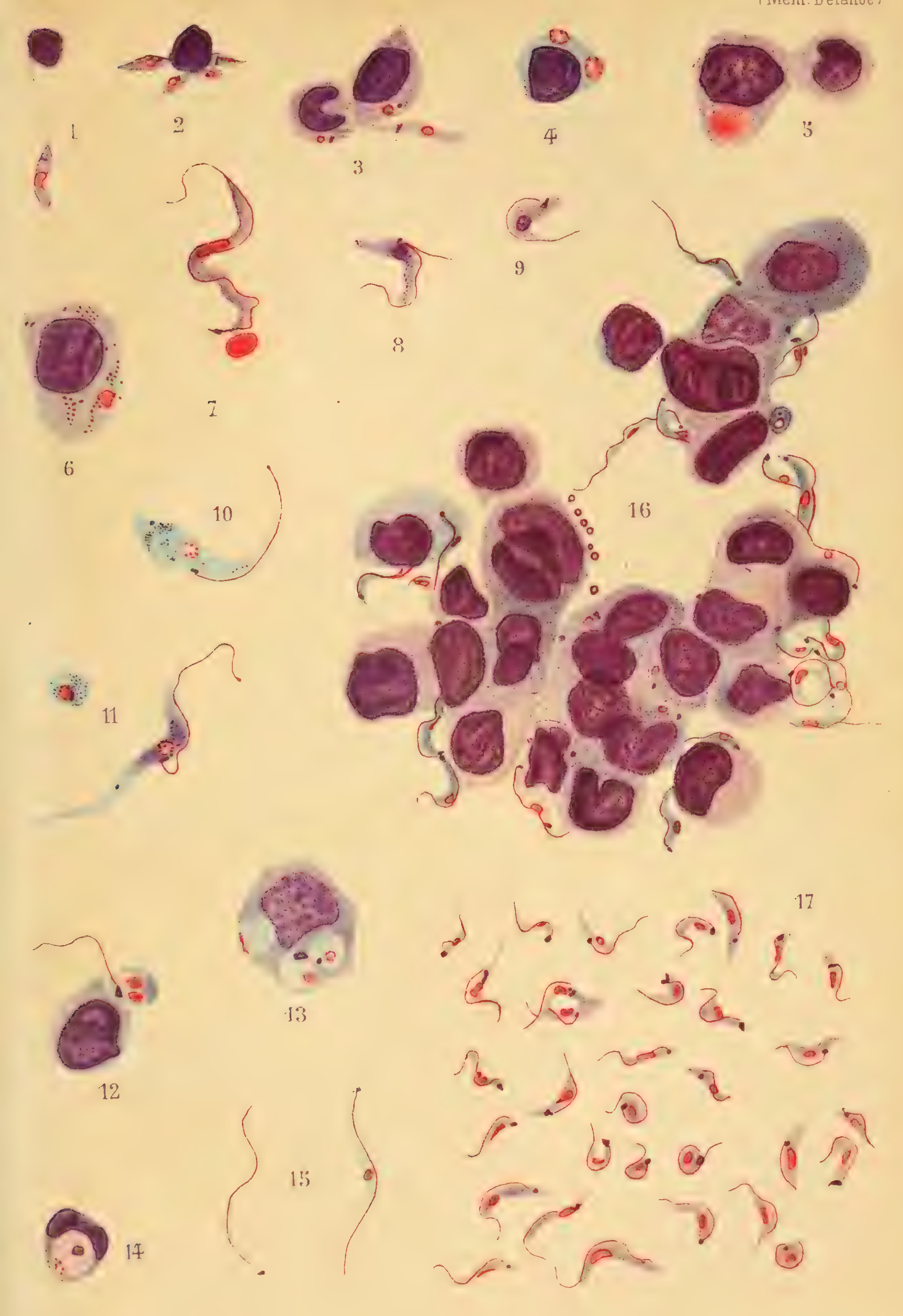


Imp. Bouchet, Cusset.

Vol. XXVI. — Pl. II.
(Mém. LINTVAREV)



Imp. Bouchet, Cusset.



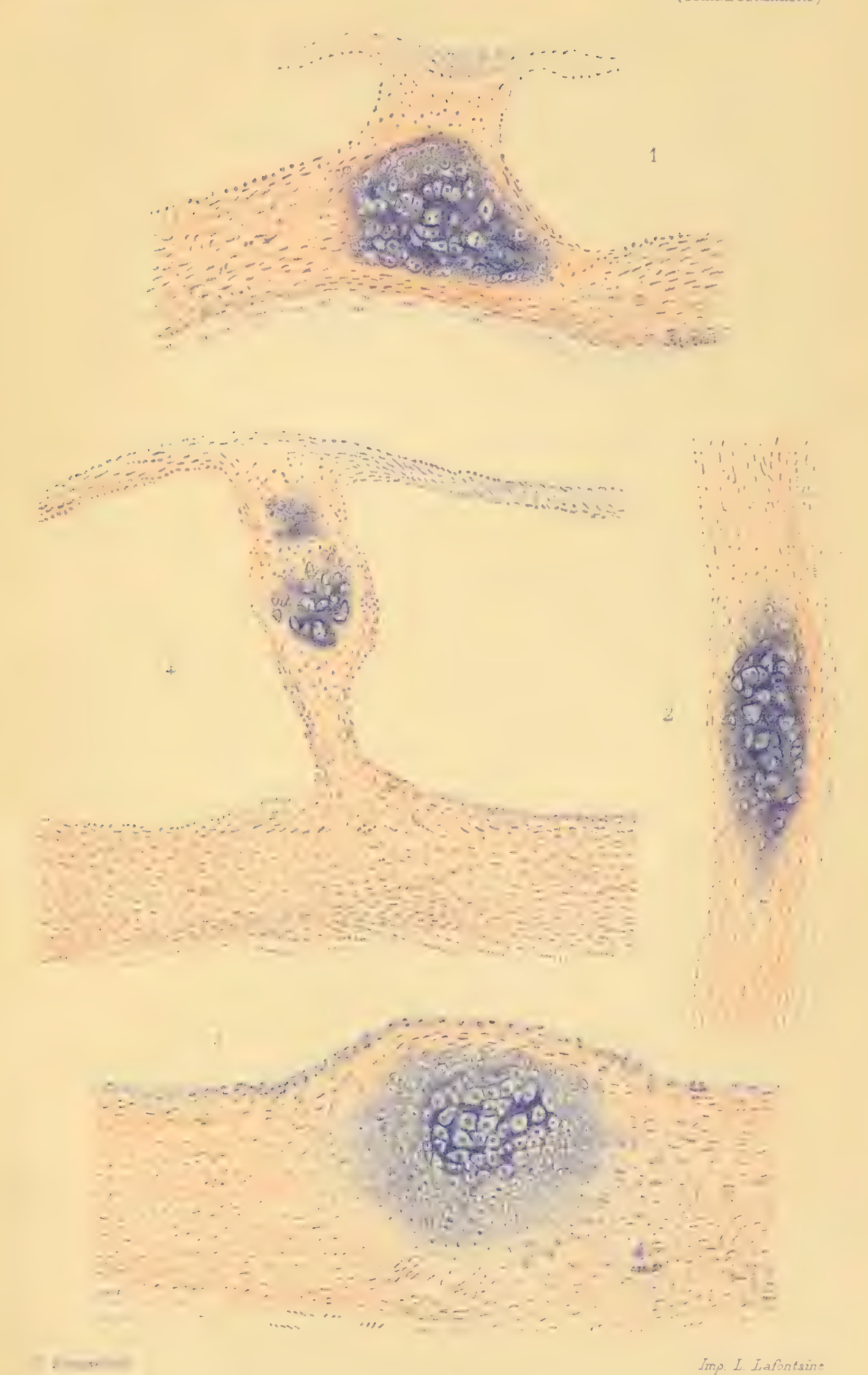
Delanoë del. V. Roussel lith
Imp. L. Lafontaine, Paris.



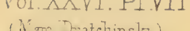


Nicolet del. Imp. L. Lafontaine, Paris. V. Roussel lith.

a
b
a
1
2
3
5
6
a
b
a
b
a
b
c
a
b
a
b
c



Imp. L. Lafontaine

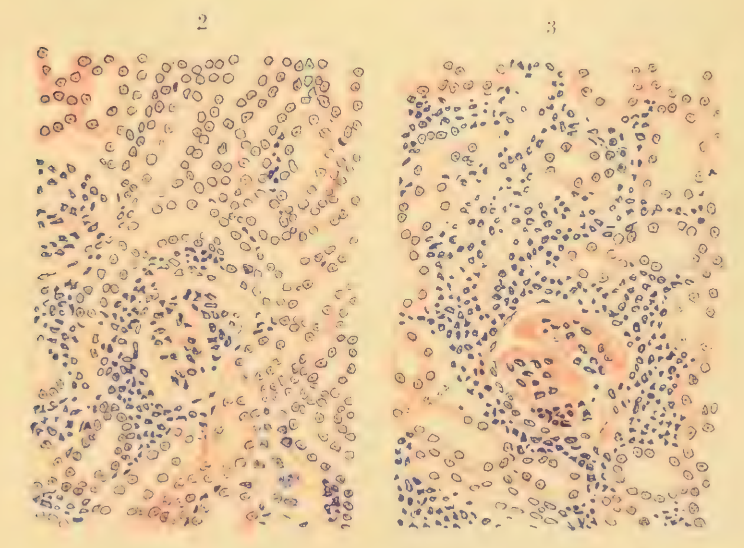


(Mém. Dratchinski)

1

2

3



V. Roussel lith.

Imp. L. Lafontaine

b

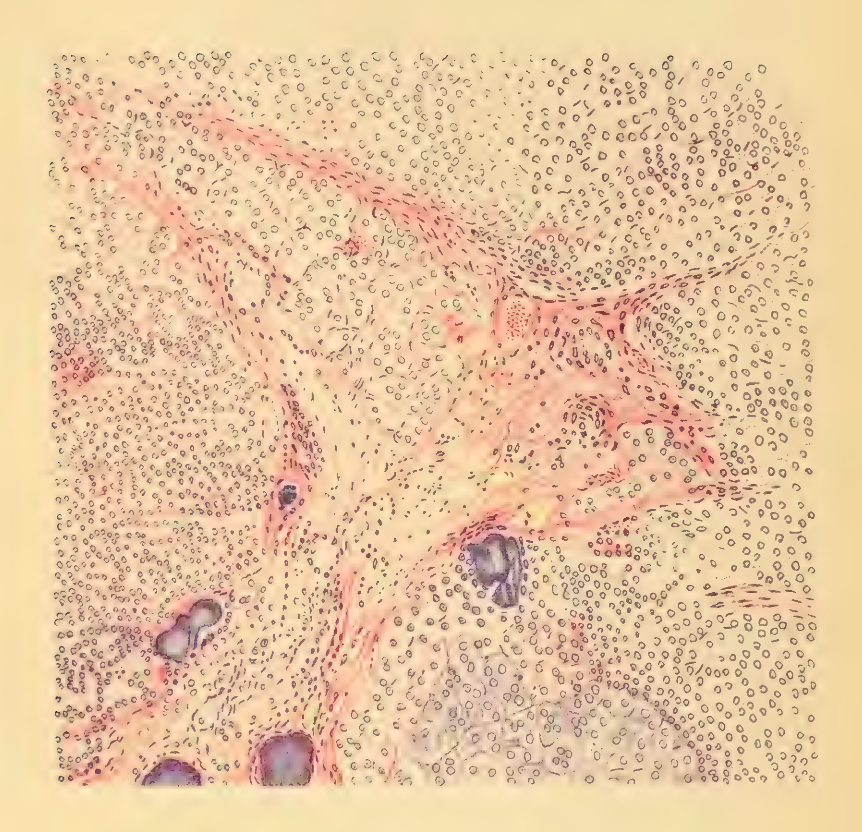
1

a



V. Roussel lith.

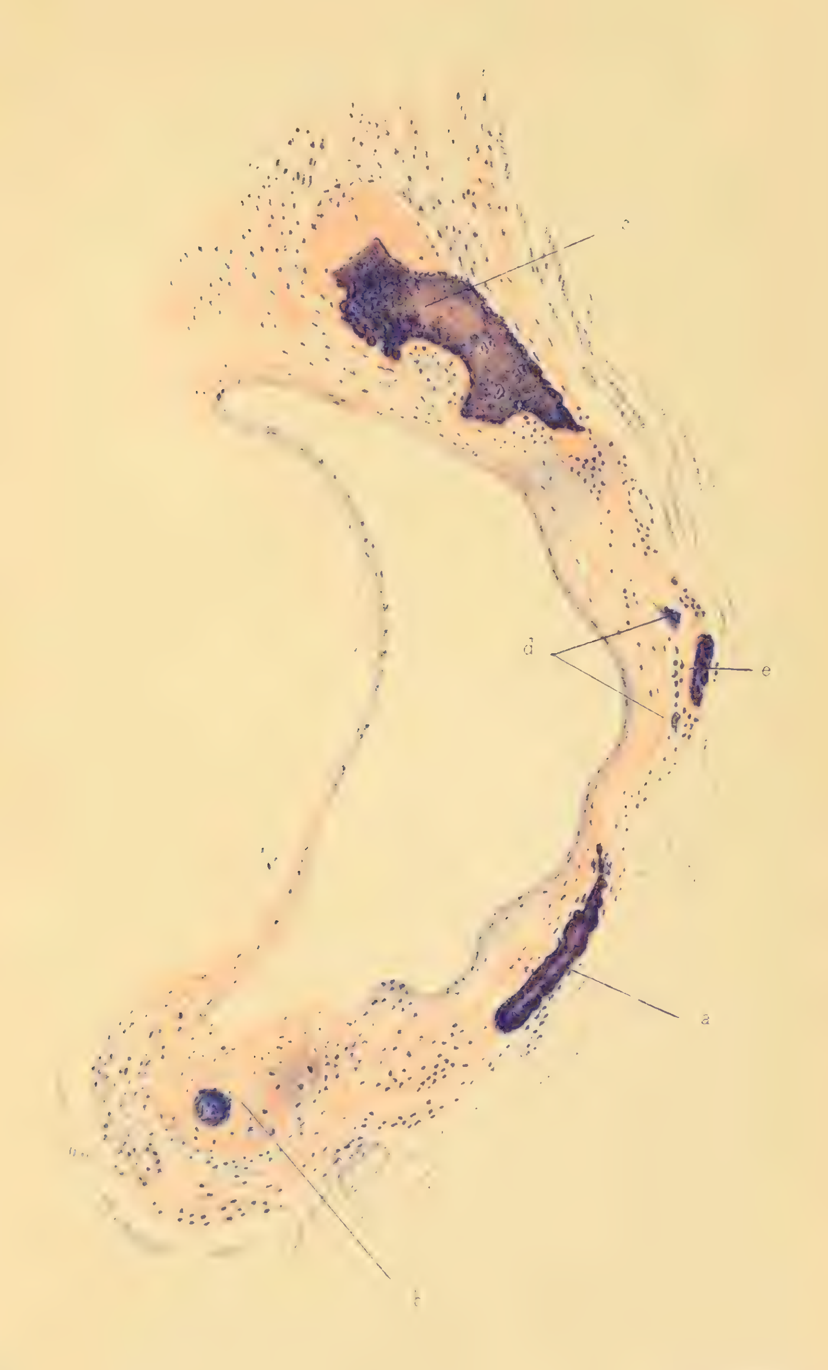
Imp. L. Lafontaine





V. Roussel lith.

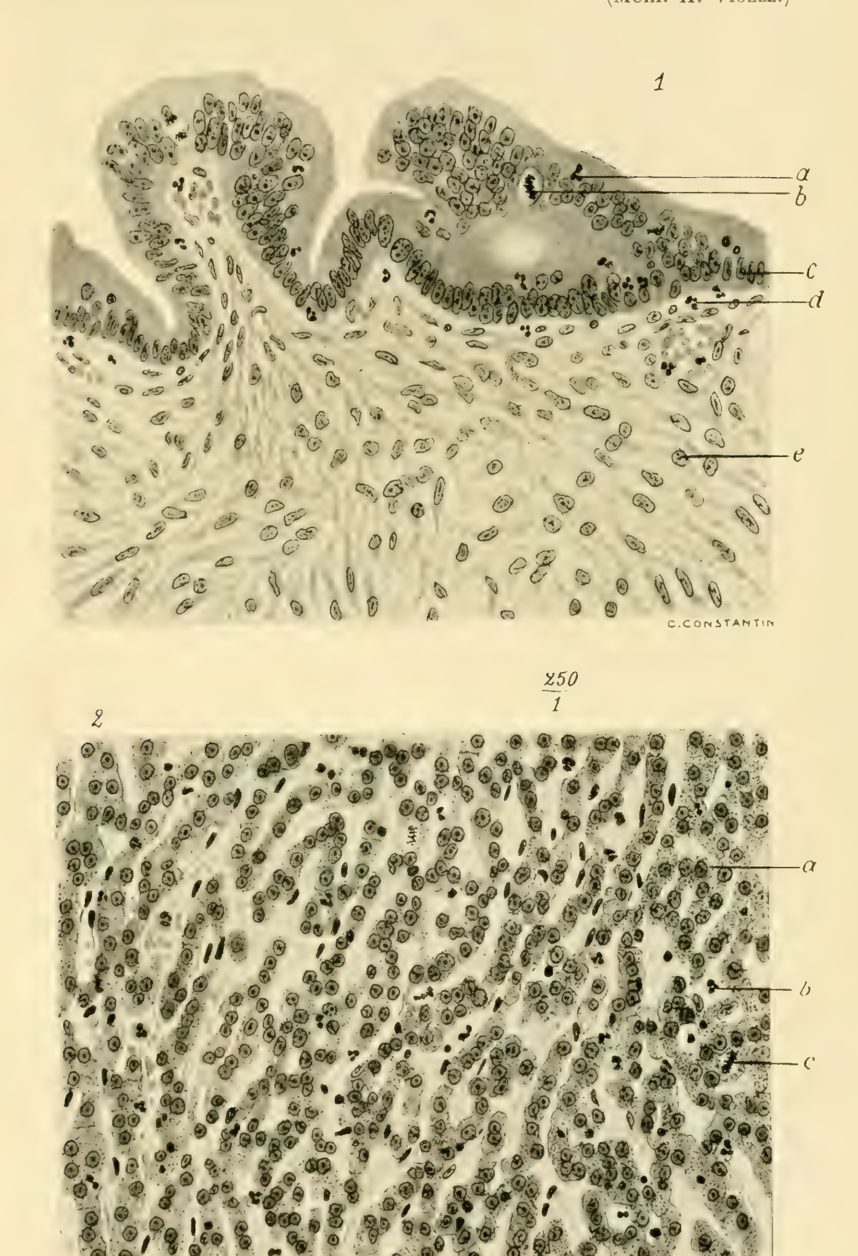
Imp. L. Lafontaine

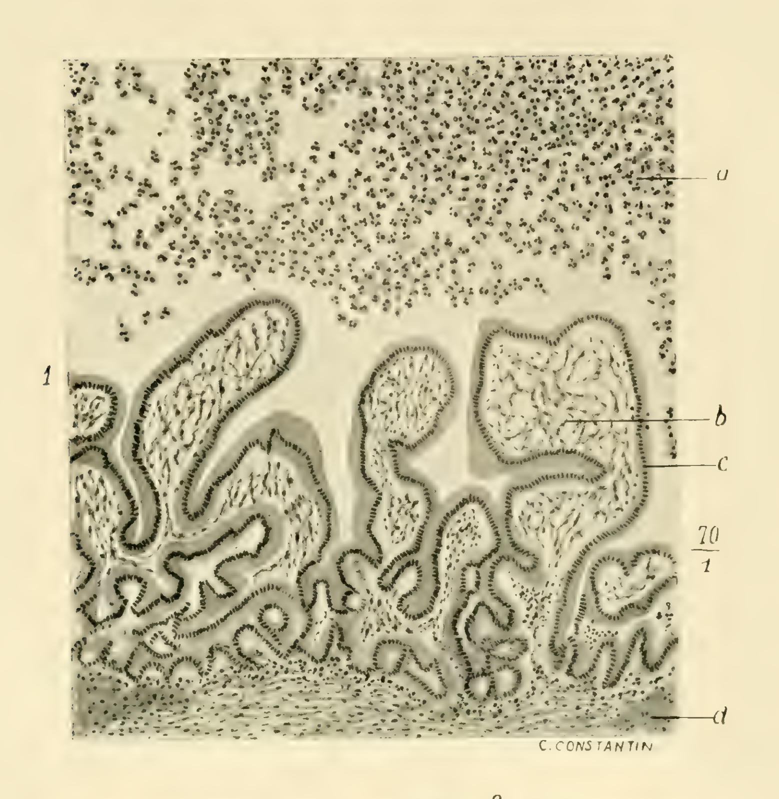


V. Roussel lith

Imp. L. Lafontaine

(Mém. H. VIOLLE.)




1
a
b
c
70/1
d
C. CONSTANTIN


2
160/1
a
b
c
d
e
f
C. CONSTANTIN.



1

2

3

4

a

b

c

d

5

6

Constantin del.

J. Roussel lith.

(Mém. Salimbeni et Géry)

7

8

9

10

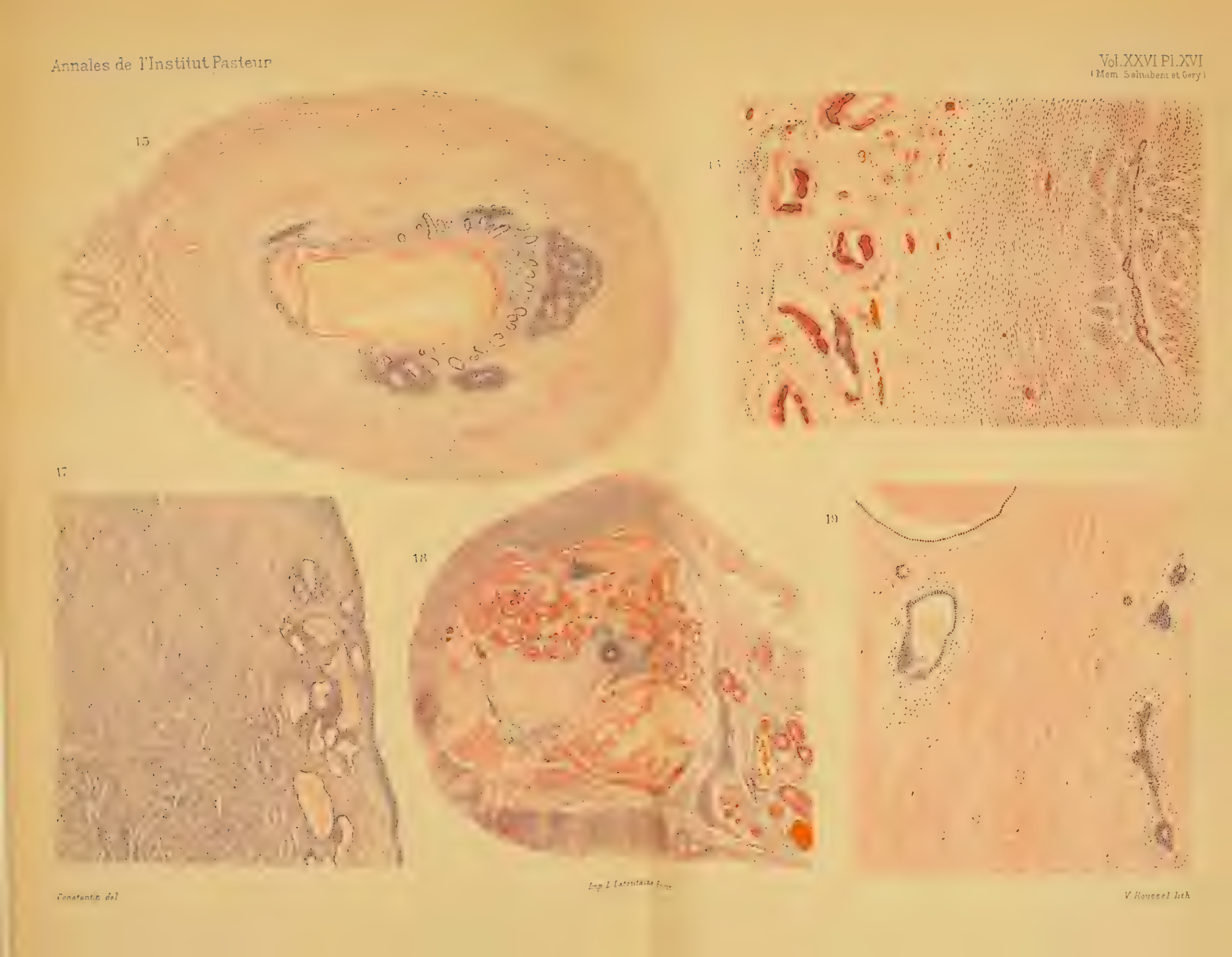
11

12

14

... del.

V. Roussel lith.



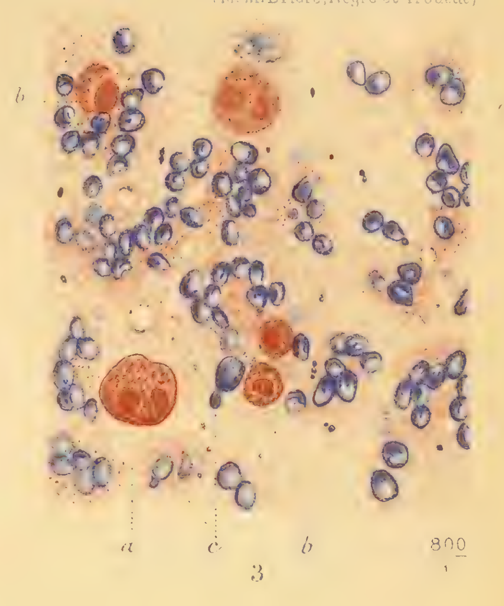
Constantin del.

Imp. L. Lafontaine

V. Roussel lith.

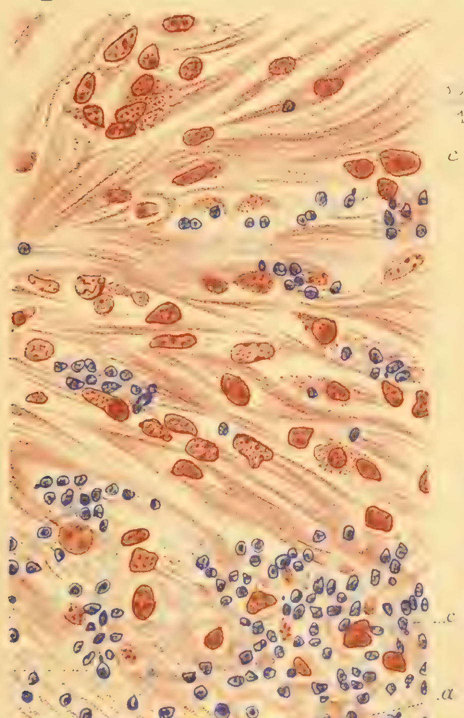


1

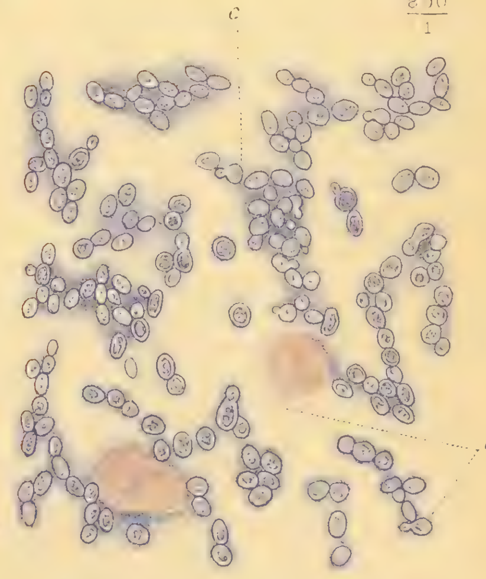


3

2



4



V. Roussel del. et lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.

1

2

3

4

5

6



7



8

F. Metchnikoff del.

Poussel lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris

(Mém. Lafont)



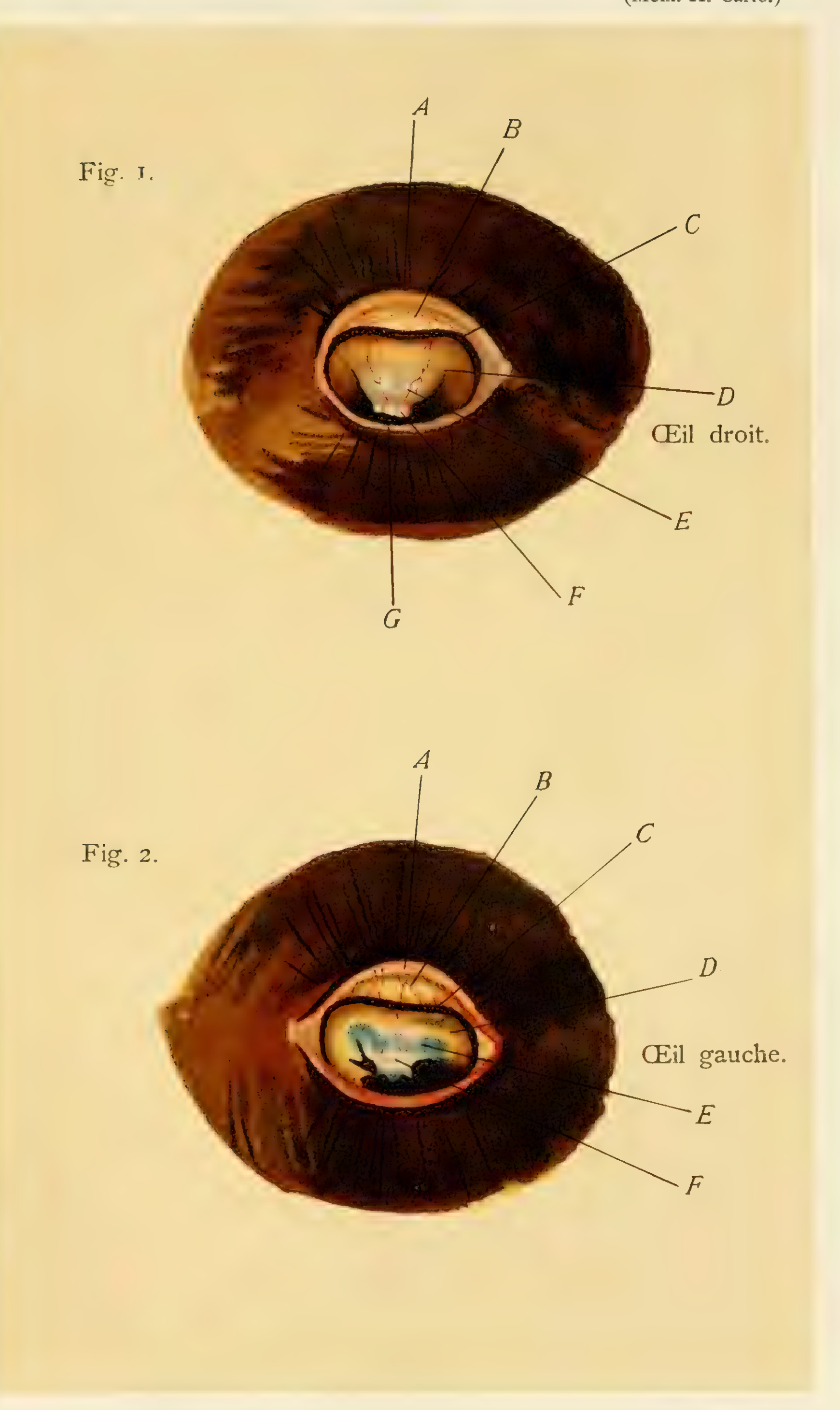
C. Constantin del. V. Roussel lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.



Constantin del. *V. Roussel lith.*

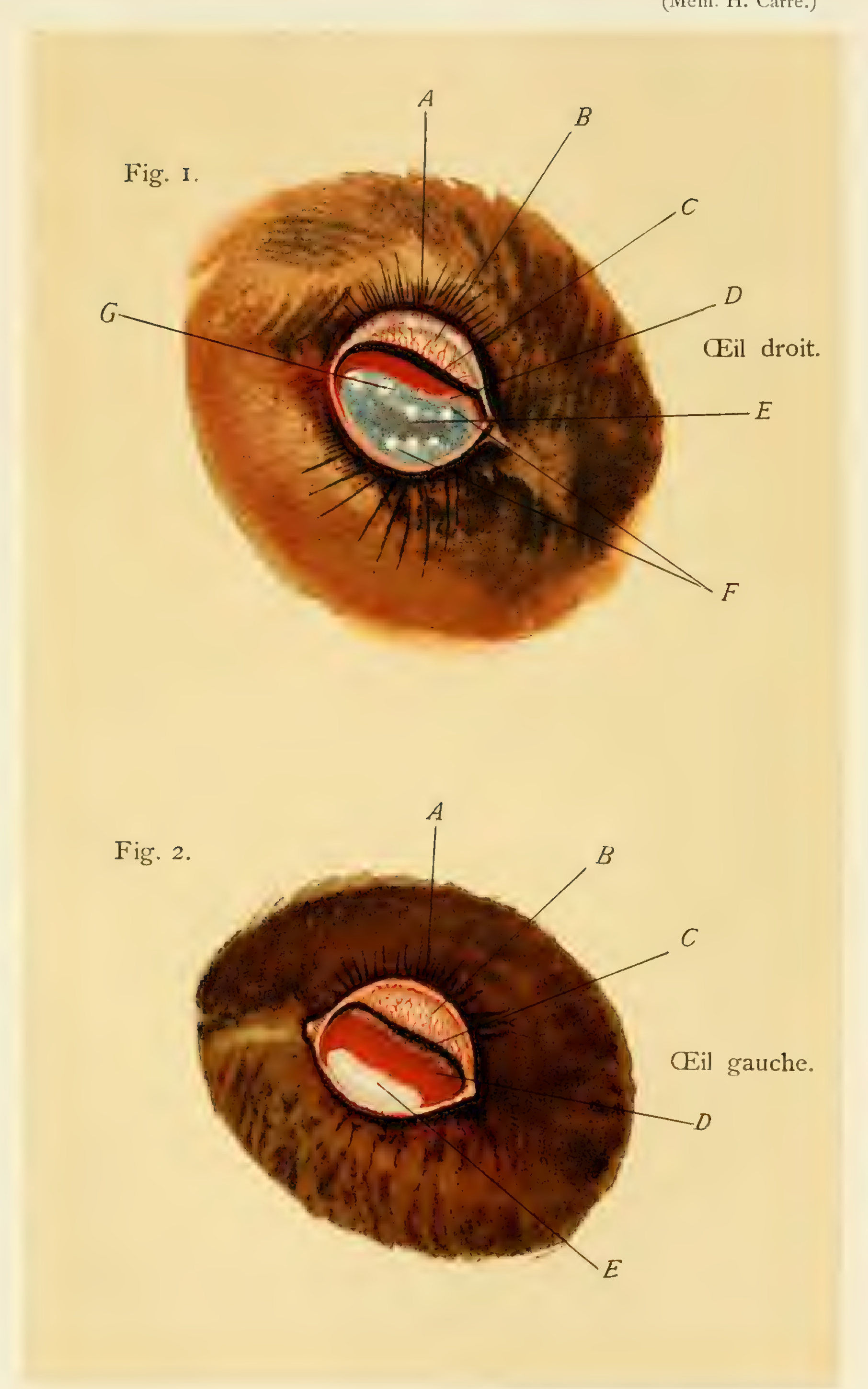
Imp. L. Lafontaine Pa



Fr. Jungen del.

Photochromie : Art. Institut Orell Füssli, Zürich.

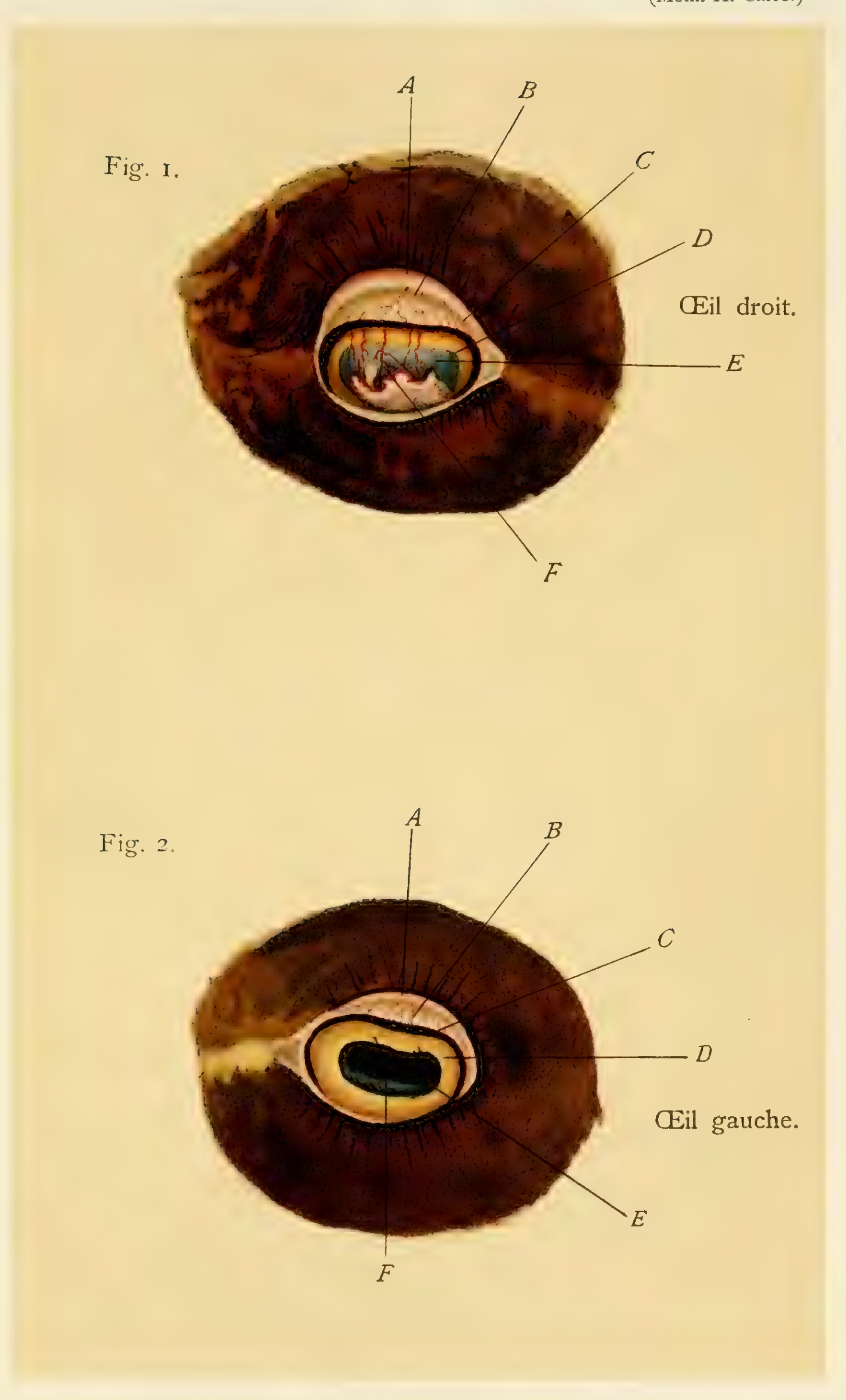
(Mém. H. Carré.)



Fr. Jungen del.

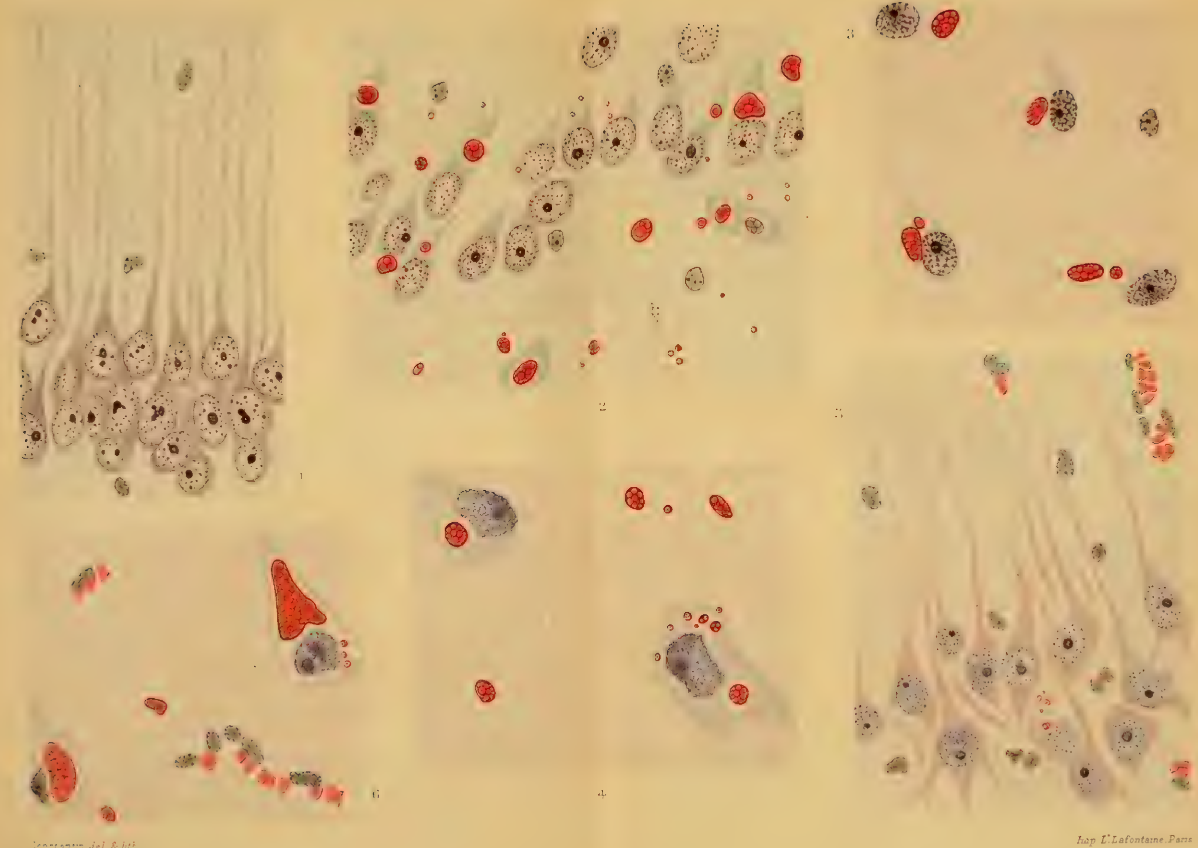
Photochromie : Art. Institut Orell Füssli, Zürich.

(Mém. H. Carré.)



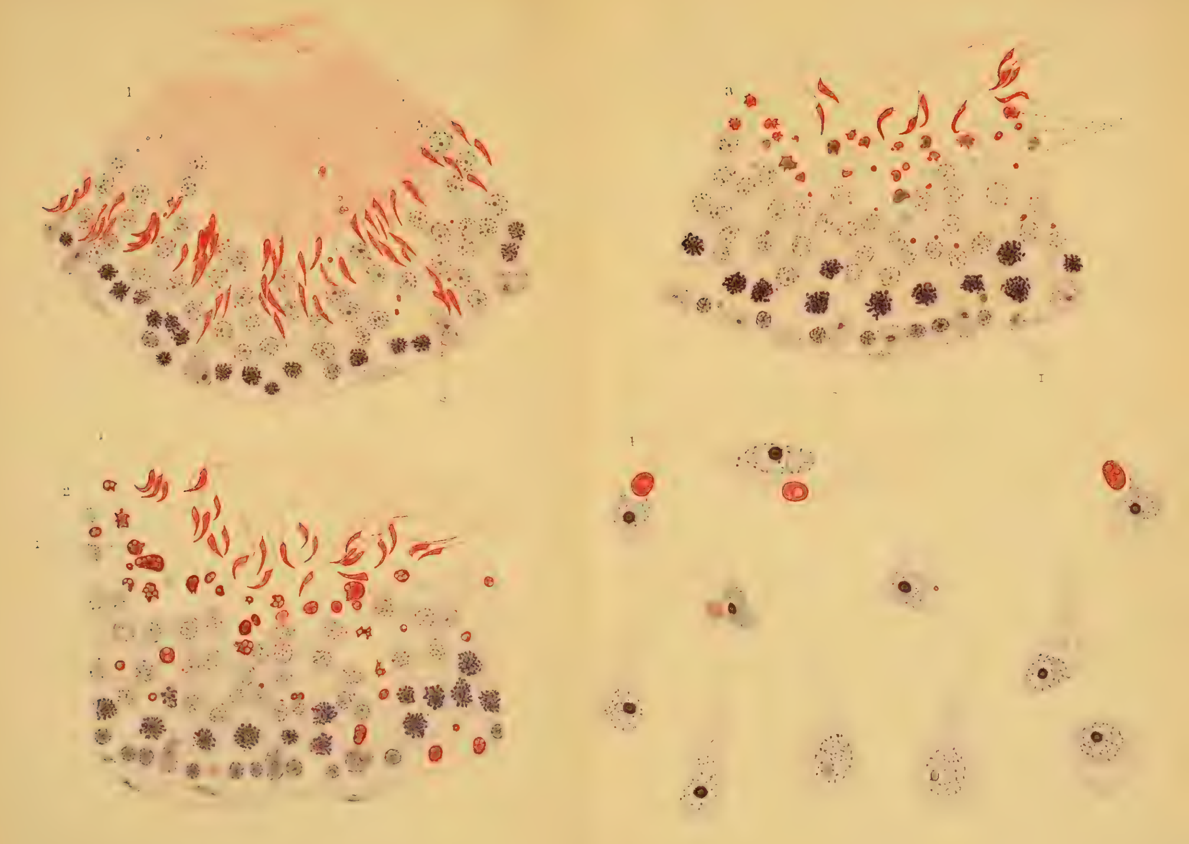
Fr. Jungen del.

Photochromie : Art. Institut Orell Füssli, Zürich.



Constantin del. & lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris



C. Constantin del. & lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

TOME VINGT-SIXIÈME
1912

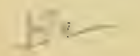
AVEC VINGT-CINQ PLANCHES

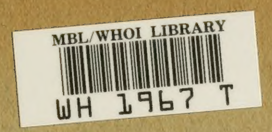
PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6[e]).



A LA MÊME LIBRAIRIE

Paris. — L. Maretheux, imprimeur, 1, rue Cassette.




MBL/WHOI LIBRARY
WH 1967 T